

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**In vitro-Untersuchungen zur Frage der Wechselwirkung
von 4-Hydroxy-Cumarinantikoagulantien mit Cytochrom
P-450 an Rattenlebermikrosomen**

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin

vorgelegt von
Werner Weber
aus Betzdorf

Mainz 1982



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552623_0012

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

In vitro-Untersuchungen zur Frage der Wechselwirkung
von 4-Hydroxy-Cumarinantikoagulantien mit Cytochrom
P-450 an Rattenlebermikrosomen

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin

vorgelegt von
Werner Weber
aus Betzdorf

Mainz 1982

Dekan: Professor Dr. med. K.-H. Bäßler

1. Gutachter: Professor Dr. med. G. F. Kahl

2. Gutachter: Professor Dr. med. E. Jähnchen

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.1982



I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
A) EINLEITUNG	1
Ziel der Arbeit	24
B) METHODEN	27
1. Herstellung der Mikrosomenfraktion	27
a) Phenobarbitalvorbehandlung der Tiere	27
b) Gewinnung und Aufbereitung der Leber- mikrosomen	27
c) Bestimmung des Proteingehaltes der Mi- krosomen und Aufteilung der Mikrosomen- fraktionen	28
2. Photometrische Messungen der p-Nitroanisol- O-Demethylierung	29
a) Prinzip	29
b) Geräte	29
c) Ansetzen der Lösungen und Inkubations- bedingungen	29
d) Versuchsablauf	30
e) p-Nitrophenol Eichkurve	32
3. Spektralanalytische Untersuchungen	34
a) Geräte	34
b) Vorbereitung	34
c) Versuchsablauf	35
d) Quantitative Auswertung oxydativer Bindungsspektren	35
4. Chemikalien	36
5. Statistische Auswertung	37
C) ERGEBNISSE	38
1. Hemmung der p-Nitroanisol-O-Demethylierung durch 4-Hydroxy-Cumarinantikoagulantien	38
2. Ergebnisse der spektralanalytischen Unter- suchungen zur Wechselwirkung verschiedener 4-Hydroxy-Cumarinderivate mit Cytochrom P-450	46
D) DISKUSSION	63
E) ZUSAMMENFASSUNG	72
F) LITERATURVERZEICHNIS	74

A) EINLEITUNG

Die pharmakologische Wirkung von Arzneimitteln im Organismus wird von ihrer Resorption, Verteilung und Elimination bestimmt. Dabei spielt die Eliminationsgeschwindigkeit für die Dauer und Stärke der Arzneimittelwirkung eine entscheidende Rolle. Die Elimination setzt sich aus zwei Teilvorgängen zusammen: der Biotransformation und der Ausscheidung. Ein Teil der dem Körper zugeführten Fremdstoffe wird auf renalem, pulmonalem und biliärem Weg, in geringerem Ausmaß auch über Haut und Schleimhäute unverändert ausgeschieden.

Bei den meisten Arzneimitteln und bei vielen Fremdstoffen handelt es sich um lipoidlösliche, wenig polare und schwach dissoziierende organische Substanzen, die von der Niere relativ schlecht ausgeschieden werden, da während der tubulären Passage eine ständige passive Rückresorption aus dem Ultrafiltrat erfolgt. Diese körperfremden Stoffe müssen daher zunächst chemisch umgewandelt werden. Das Ziel dieser Biotransformation ist im allgemeinen die Entstehung wasserlöslicher, höher polarer und damit leichter ausscheidbarer Metabolite (MUTSCHLER, 1981).

Führt der Umbau von pharmakologisch aktiven und toxischen Fremdstoffen zu Produkten, die eine geringere Wirksamkeit aufweisen als die Ausgangssubstanzen, so spricht man von einer Entgiftung. Umgekehrt kann die chemische Umwandlung im Organismus aber auch zur Entstehung wirksamerer Metabolite führen. Diesen Prozess bezeichnet man als Giftung (CONNEY, 1980).

Entsprechend der Mannigfaltigkeit chemischer Verbindungen, die als Fremdstoffe in den Körper gelangen, verfügt der Organismus über zahlreiche Möglichkeiten der Biotransformation, die hier nur im Prinzip angedeutet werden können. Ausführliche Darstellungen der Stoffwechselwege des Arzneimittelstoffwechsels finden sich in Arbeiten von BRODIE et al. (1958), WILLIAMS (1959) und NETTER (1962 u. 1972).

Das nachfolgende modifizierte Schema nach NETTER (1972) gibt einen Überblick über die wichtigsten Reaktionen des Arzneimittelstoffwechsels:

A. Nicht-synthetische Reaktionen

1. Oxydation

a) Oxydation aromatischer Ringe

z. B. Acetanilid (MITOMA et al., 1956)

b) Oxydation von Alkylketten

z. B. Hexobarbital (BRODIE et al., 1958)

c) Oxydative Desalkylierung

z. B. p-Nitroanisol (NETTER, 1960) und
Codein (MANNERING et al., 1954)
als O-Demethylierung

z. B. Amidopyrin (PECHTHOLD, 1964)
als N-Desalkylierung

d) Oxydative Desaminierung

z. B. Amphetamin (AXELROD, 1955)

e) Sulfoxydation

z. B. Chlorpromazin (GILLETTE und KAMM, 1960)

f) Epoxydation

z. B. Benzo(a)pyrenepoxidierung (SIMS et al.,
1974)

2. Reduktion

a) Azoreduktion

b) Nitroreduktion

3. Hydrolyse

a) Esterspaltung

b) Amidspaltung

B. Synthetische Reaktionen

1. Glucoronidierung

2. Sulfatierung

3. Methylierung

4. Acetylierung

5. Konjugation mit Aminosäuren

Der Metabolismus von Arzneimitteln und anderen Fremdstoffen läuft im allgemeinen in zwei Stufen ab. In dem ersten, nichtsynthetischen Reaktionsschritt führen oxydative, reduktive oder hydrolytische Veränderungen des Wirkstoffmoleküls zu einer Inaktivierung oder zur Umwandlung einer zunächst inaktiven Verbindung in einen aktiven Metaboliten bzw. einer aktiven Verbindung in eine andere aktive Verbindung. Das nun konjugierbar gewordene Produkt wird in der zweiten Stufe des Arzneimittelstoffwechsels, einem synthetischen Schritt, an eine vorher aktivierte körpereigene Transportsubstanz gekoppelt. Bei manchen Arzneimitteln kann die synthetische Reaktion unmittelbar erfolgen (MUTSCHLER, 1981).

Die Biotransformation von Arzneimitteln und anderen Fremdstoffen findet vorwiegend in der Leber statt, daneben zeigen aber auch andere Organe wie Nieren, Lungen, Darm, Gehirn und Blut eine gewisse Stoffwechselaktivität. Ein besonderes Enzymsystem, die Arzneimittelhydroxylasen, ist im endoplasmatischen Retikulum der Leberzelle lokalisiert und katalysiert den oxydativen Abbau von Pharmaka (BRODIE et al., 1953 und 1955; MITOMA und UDENFRIED, 1955).

Das endoplasmatische Retikulum der Leberzelle stellt sich elektronenoptisch als dreidimensionales Netzwerk cytoplasmatischer Membranen verschieden geformter Oberfläche dar. Morphologisch und funktionell lassen sich zwei über ein röhrenartiges Hohlsystem miteinander kommunizierende Kompartimente unterscheiden. Das rauhe endoplasmatische Retikulum ist an seiner Oberfläche mit Ribonukleoproteingranula (PALADE, 1956), den Ribosomen, besetzt. Hier findet die Proteinsynthese statt (RAACKE, 1961). Daneben wurden glatte Membranen beschrieben, die an ihrer Oberfläche keine Granula tragen. Man nimmt an, daß die arzneimittelabbauenden Enzyme vorwiegend im glatten endoplasmatischen Retikulum vorhanden sind (FOUTS, 1961). Mikrosomen stellen keine anatomisch genau definierten Partikeln dar, sie sind vielmehr

Fragmente des endoplasmatischen Retikulums (FOUTS, 1971) und entstehen als heterogene Fraktion bei der Homogenisierung und differenzierten Ultrazentrifugation (CLAUDE, 1938). Sie sind durch ihr Verhalten im Schwerfeld der Ultrazentrifuge und ihre spezielle biochemische Leistung charakterisiert.

Der oxydative Arzneimittelstoffwechsel wurde sehr eingehend von zahlreichen Autoren untersucht. Seit den Untersuchungen von BRODIE und Mitarbeitern (1955) ist bekannt, daß bei der Fremdstoffhydroxylierung die Anwesenheit von NADPH und molekularem Sauerstoff erforderlich ist. MASON (1957) prägte für Reaktionen dieses Typs den Ausdruck mischfunktionelle Oxydation und stellte sie in einer allgemeinen Gleichung folgendermaßen dar:



Dabei wird von den zwei Atomen eines Sauerstoffmoleküls das eine auf das Akzeptormolekül übertragen, während das andere Sauerstoffmolekül mit Hilfe eines Wasserstoffdonators zu Wasser reduziert wird. Wie experimentell gezeigt wurde, stammt der in das Substrat eingebaute Sauerstoff aus der Atmosphäre (HAYAISHI et al., 1956; POSNER et al., 1961). Enzyme, die diese Reaktion katalysieren, nannte MASON (1957) entsprechend " mixed function oxydases " (mischfunktionelle Oxydasen), weil sie zwei gegenseitig abhängige katalytische Aktivitäten aufweisen, nämlich Reduktion eines Atoms des Sauerstoffmoleküls gekoppelt mit der spezifischen Oxygenierung oder Hydroxylierung des anderen Atoms. HAYAISHI (1962) bezeichnete diese Enzyme daher als " Monooxygenasen ".

Über den Mechanismus der Sauerstoffübertragung auf das Akzeptormolekül herrscht noch keine völlige Klarheit. Man nimmt heute allgemein an, daß in den Lebermikrosomen (im endoplasmatischen Retikulum) ein der mitochondrialen Atmungskette ähnliches Elektronentransportsystem existiert,

welches die erforderlichen reduktiven Äquivalente für die mischfunktionelle Oxydation von Arzneimitteln und anderen Fremdstoffen liefert (ESTABROOK und COHEN, 1969). Die Endoxidase dieser Enzymkette (COOPER et al., 1979; PETERSON et al., 1977), das Cytochrom P-450, wird sowohl für die Sauerstoffaktivierung (ESTABROOK et al., 1963; COOPER et al., 1965 u. 1979; OMURA et al., 1965; GILLETTE et al., 1972), als auch für die Substratbindung (IMAI und SATO, 1966; REMMER et al., 1966; SCHENKMAN et al., 1967 u. 1973) verantwortlich gemacht.

Cytochrom P-450 wurde nach der Einführung der Differenzspektrophotometrie durch CHANCE im Jahre 1957, die nun auch Messungen innerhalb trüber biologischer Medien erlaubte, auf Grund seines ungewöhnlichen spektralen Verhaltens entdeckt. 1958 berichteten unabhängig voneinander KLINGENBERG und GARFINKEL erstmals über das Vorkommen eines " CO-bindenden Pigmentes " in Ratten- bzw. Schweinelebermikrosomen (KLINGENBERG, 1958; GARFINKEL, 1958). Nach CO-Begasung - zuvor mit Dithionit oder NADH reduzierter Mikrosomen - beobachteten sie eine intensive Absorptionsbande mit einem Absorptionsmaximum bei 450 nm, die später zu dem Namen " P-450 " führte (OMURA und SATO, 1962). Auffallend war das Fehlen weiterer Absorptionsbanden im sichtbaren Bereich, wie sie für Hämoproteine typisch sind (KLINGENBERG, 1958; GARFINKEL, 1958). Über die chemische Natur dieses Pigmentes sowie über seine biologische Funktion war daher zunächst nicht viel bekannt. Erst 1962 gelang es dann OMURA und SATO die Hämoproteinnatur des Pigmentes zu demonstrieren. Sie charakterisierten es als b-Typ-Cytochrom mit ungewöhnlichen spektralen Eigenschaften (OMURA und SATO, 1962).

Cytochrom P-450 liegt in der Natur in einer an mikrosomale Strukturen gebundenen Form vor, es wurde daher auch als " Reticulochrom " (OMURA und SATO, 1964 b) bezeichnet.

Durch solubilisierende Maßnahmen wie Behandlung mit Detergentien wie z. B. Desoxycholat (OMURA und SATO, 1962 u. 1964 a + b), Schlangengift (OMURA und SATO, 1964 a + b), Harnstoff (MASON et al., 1965) oder Neutralsalzen (IMAI und SATO, 1967 b) wird unter anaeroben Bedingungen die Bindung zwischen Hämoprotein und mikrosomalem Lipid aufgebrochen. Es entsteht in stöchiometrischer Menge die inaktive lösliche Form des Pigmentes, welche völlig andere spektrale Eigenschaften aufweist als die membran-gebundene Form des Cytochrom P-450 (IMAI und SATO, 1967 b). ICHIKAWA und YAMANO (1967) konnten zeigen, daß es sich hierbei um einen reversiblen Vorgang handelt. Das CO-Differenzspektrum der solubilisierten Form des Cytochrom P-450 ist durch eine intensive Soretbande bei 420 nm charakterisiert und ist typisch für Hämoproteinderivate (OMURA und SATO, 1962 u. 1964 a + b). Zur Unterscheidung von der membrangebundenen Form Cytochrom P-450 nannten OMURA und SATO (1962) die solubilisierete Form " Cytochrom P-420 ".

Im Gegensatz zum Cytochrom P-420, welches bereits von OMURA und SATO (1964 b) isoliert und gereinigt werden konnte, gelang die Reindarstellung des Cytochrom P-450 erst im Laufe der letzten zehn Jahre. Zunächst waren es KATAGIRI und Mitarbeiter (1968), die Cytochrom P-450 aus *Pseudomonas putida* isolierten. Danach berichteten RYAN et al. (1978 u. 1979), sowie GUENGERICH (1978) und MIKI et al. (1980) über verfeinerte Methoden zur Reindarstellung und Isolierung von Cytochrom P-450.

Die Darstellung des Absolutspektrums von Cytochrom P-450 gelang zunächst trotz des interferierenden Einflusses des Cytochrom b_5 unter oxydativen und reduktiven Bedingungen, indem entweder der störende Einfluß des Cytochrom b_5 optisch ausgeglichen wurde (KINOSHITA und HORIE, 1967; REMMER et al., 1969) oder das Cytochrom b_5 präparativ

aus den Mikrosomen entfernt wurde (MIYAKE et al., 1968). Übereinstimmend gaben alle Autoren ein dreigipfliges Absolutspektrum des oxydierten Cytochrom P-450 mit Absorptionsmaxima von 415 - 418 nm im Soret-Bereich und 532 - 537 nm im β bzw. von 565 - 570 nm im α -Bereich des sichtbaren Lichtes an. Das reduktive Absolutspektrum zeigt dagegen nur zwei Gipfel, einen im Soret-Bereich bei 412 - 415 nm, einen weiteren im sichtbaren Bereich bei 540 - 545 nm (REMMER et al., 1969; MIYAKE et al., 1968; SATO et al., 1969). Durch die Möglichkeiten der Reindarstellung des Cytochrom P-450 ist die Aufnahme von Absolutspektren heute kein grundsätzliches Problem mehr (KAHL und KAHL, 1981).

Das Cytochrom P-450 selbst ist, wie man heute weiß, heterogener Natur (CONNEY, 1980) mit unterschiedlicher katalytischer Funktion (KAMINSKY et al., 1980). Schon SLADEK und MANNERING (1969) vermuteten, daß unterschiedliche Vorbehandlung der **Versuchstiere** die Synthese unterschiedlicher Formen des Cytochrom P-450 zur Folge hat. Während Induktion mit 3-Methylcholanthren (3-MC) zur Synthese von Cytochrom P-448 führt (ALVARES et al., 1967), welches sich in vieler Hinsicht von Cytochrom P-450 unterscheidet (SHOEMAN et al., 1973), entstehen nach Phenobarbitalstimulierung (PB) wenigstens drei verschiedene Formen von Cytochrom P-450 (LEVIN et al., 1980). Durch immunchemische Untersuchungen konnten THOMAS et al. (1976) sogar die Existenz mindestens sechs verschiedener Cytochrom P-450-Formen an Rattenlebermikrosomen nachweisen. NEBERT (1979) vermutet sogar, daß es sich beim Cytochrom P-450 um eine sehr große Familie nuanciert verschiedener Unterformen handelt, die in der Auseinandersetzung mit Induktoren analog zu immunologischen Anpassungsvorgängen entstehen können (KAHL u. KAHL, 1981). Neuere Forschungen haben ergeben, daß unter ontogenetischen Gesichtspunkten eine weitere Differenzierung von Unterformen des Cytochrom P-448, welches synonym

auch Cytochrom P₁-450 (SLADEK, 1966; SLADEK und MANNERING, 1969) genannt wird, möglich ist (KAHL et al. 1980). Auch beim Menschen konnten inzwischen bereits verschiedene Cytochrom P-450-Formen nachgewiesen werden (BOBIS et al., 1980).

Neben dem Cytochrom P-450 enthalten Lebermikrosomen, wie schon oben angedeutet wurde, ein weiteres Hämoprotein, das Cytochrom b₅ (STRITTMATTER und BALL, 1954). Schon 1940 hatten KEILIN und HARTREE dieses Cytochrom in Mitochondrien entdeckt und spektrale Charakteristika beschrieben. Später gelang es, das Cytochrom b₅ (PAPPENHEIMER und WILLIAMS, 1954), welches zunächst als Cytochrom m (STRITTMATTER und BALL, 1954) bezeichnet wurde, auch aus Lebermikrosomen zu isolieren und zu reinigen (STRITTMATTER und VELICK, 1956). Bei der Untersuchung seiner spektralen Eigenschaften wurden Absorptionsmaxima im Soret-Bereich bei 414 nm bzw. 423 nm für die oxydierte bzw. reduzierte Form des Cytochrom b₅ gefunden. Die CO-Verbindung des Cytochrom b₅ wies ein Absorptionsmaximum bei 426 nm auf (STRITTMATTER und VELICK, 1956).

Die Funktion des Cytochrom P-450 beim Ablauf der mischfunktionellen Oxydation stellt man sich heute in vereinfachter Weise etwa folgendermaßen vor (KAHL und KAHL, 1981) : das hämgebundene Eisen des Cytochrom P-450 unterliegt einem zyklischen Valenzwechsel. Am Anfang des in mehreren Schritten ablaufenden Reduktions-Oxydations-Zyklus erfolgt zunächst die Bindung des zu hydroxylierenden Substrates an oxydiertes Cytochrom P-450 (GILLETTE und GRAM, 1969). Der entstandene Cytochrom P-450-Substratkomplex wird im nun folgenden Schritt durch die Übertragung eines Elektrons, das aus dem NADPH-Cytochrom c-Reduktase-System stammt (WILLIAMS und KAMIN, 1962; KAMIN et al., 1964; PETERSON et al., 1977), reduziert. In

einem weiteren Schritt wird molekularer Sauerstoff an den reduzierten Cytochrom P-450-Substratkomplex angelagert (GILLETTE und GRAM, 1969). Nach Aufnahme eines zweiten Elektrons, welches wahrscheinlich vom Cytochrom b_5 übertragen wird (HILDEBRANDT und ESTABROOK, 1971), zerfällt der Substrat-Sauerstoffkomplex des reduzierten Cytochrom P-450 (GILLETTE und GRAM, 1969). Dabei werden das hydroxylierte Substrat, Wasser und Cytochrom P-450 in seiner Ferriform freigesetzt. Diese steht nun wieder zur Bindung eines Substratmoleküls zur Verfügung, womit ein neuer Reduktions-Oxydationszyklus eingeleitet wird (GILLETTE und GRAM, 1969; HILDEBRANDT und ESTABROOK, 1971; CORREIA und MANNERING, 1973; PETERSON et al., 1977; KAHL und KAHL, 1981).

Die mischfunktionelle Oxydation ist also offenbar ein Zwei-Elektronenprozess, d. h. es werden bei der gekoppelten Reduktion des Sauerstoffs und der Oxygenation des Substrates zwei Elektronenäquivalente benötigt (ESTABROOK et al., 1969). Allgemein akzeptiert wird ein NADPH-abhängiger Elektronentransportweg, der das für die Reduktion des Cytochrom P-450 bzw. des Cytochrom P-450-Substratkomplexes benötigte erste Elektron liefert (ESTABROOK et al., 1969; SATO et al., 1969; GIGON et al., 1969; PETERSON et al., 1977):

NADPH - NADPH-Cytochrom c-Reduktase - " X " - Cytochrom P-450

Ein Flavoprotein, die sogenannte NADPH-Cytochrom c-Reduktase (WILLIAMS und KAMIN, 1962), überträgt direkt oder indirekt über ein postuliertes Zwischenglied " X " (DALLNER et al., 1966) ein Elektronenäquivalent auf Cytochrom P-450 (ORRENIUS und ERNSTER, 1964). Bei dem bisher nur in Mitochondrien nachgewiesenen " X " (OMURA et al., 1966) soll es sich um ein nicht-hämgebundenes Eisen enthaltendes Protein (" non-heme-iron-protein ") handeln.

Umstritten ist dagegen ein weiterer Elektronentransportweg, der für die Lieferung des zweiten Elektrons diskutiert wird (ESTABROOK et al., 1969). Experimentelle Befunde von COHEN und ESTABROOK (1971) sowie von HILDEBRANDT und ESTABROOK (1971) sprechen eindeutig für die Existenz dieses zweiten Elektronentransportweges:

NADH - NADH-Cytochrom b_5 - Reduktase - Cytochrom b_5 -
Cytochrom P-450

Das in Lebermikrosomen nachgewiesene Hämoprotein Cytochrom b_5 (STRITTMATTER und BALL, 1952 und 1954) übernimmt demnach reduzierende Äquivalente vom NADH über ein vorgeschaltetes Flavoprotein, die sogenannte NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase (STRITTMATTER, 1958), und überträgt diese auf das oxygenierte Zwischenprodukt des Cytochrom P-450. Zusätzliche reduzierende Äquivalente werden möglicherweise durch eine Interaktion mit dem NADPH-Cytochrom c-Reduktase-System sozusagen im "bypass" geliefert (HILDEBRANDT und ESTABROOK, 1971). Als geschwindigkeitslimitierender Schritt der mischfunktionellen Oxydation wird die Reduktion des Cytochrom P-450-Substratkomplexes angesehen (GILLETTE und GRAM, 1969).

Die Entstehung charakteristischer Differenzspektren bei Zugabe von Arzneimitteln und anderen Substraten zu Lebermikrosomensuspensionen hat die Erforschung der Wirkungsweise des Cytochrom P-450 sehr erleichtert. Diese Differenzspektren repräsentieren die Bindung des Substrates an oxydiertes Cytochrom P-450 (SCHENKMAN et al., 1967). Charakteristische spektrale Veränderungen wurden erstmals von NARASIMHULU und Mitarbeitern (1965) nach Zugabe von 17-Hydroxy-Progesteron zu Nebennierenmikrosomen beobachtet. Während REMMER et al. (1966) zunächst zwei unterschiedliche oxydative Differenzspektren beschrieb, teilt man heute die Substrate in drei verschiedene Typen ein (YOSHIDA, KUMAOKA, 1975): die sogenannten

Typ I-Substrate, z. B. Hexobarbital, sind charakterisiert durch ein Absorptionsmaximum bei etwa 390 nm und ein Absorptionsminimum bei 420 nm (REMMER et al., 1966; IMAI und SATO, 1966; SCHENKMAN et al., 1967).

Typ I-Spektren sind Ausdruck für die Entstehung eines Enzym-Substrat-Komplexes zwischen mikrosomalem Cytochrom P-450 und dem betreffenden Substrat ohne irgendeine direkte Häm-Substrat-Interaktion (SCHENKMAN et al., 1973). Als typische Vertreter der Typ I-Substrate gelten: Barbiturate, Amidopyrin, Chlorpromazin und Äthylmorphin, daneben aber auch einige Hormone wie z. B. Testosteron und Östradiol sowie eine große Anzahl weiterer Verbindungen, die von einfachen Alkanen bis zu aromatischen Heterozyklen reichen (SCHENKMAN et al., 1967).

Die zweite Gruppe, darunter als Prototyp das Anilin, werden als Typ II-Substrate bezeichnet. Ihr oxydatives Differenzspektrum ist gekennzeichnet durch das Auftreten eines Absorptionssgipfels zwischen 425 und 435 nm und eines Absorptionstales bei etwa 390 nm (REMMER et al., 1966; IMAI und SATO, 1966; SCHENKMAN et al., 1967). Typ II-Spektren entstehen als Folge einer Fe-Hämochrom-Formation mit dem Substrat, welches direkt mit dem Häm des Cytochrom P-450 in Wechselbeziehung tritt. Daneben hat aber möglicherweise auch eine Interaktion mit dem Proteinbestandteil des Cytochrom P-450 einen gewissen Anteil an der Entstehung des Differenzspektrums (SCHENKMAN et al., 1973).

Bei den Typ II-Substraten scheint es sich in erster Linie um stickstoffhaltige Substanzen wie Anilin, Nikotin, Nikotinamid, Pyridin und p-Aminophenol zu handeln (SCHENKMAN et al., 1967).

Daneben gibt es eine Reihe anderer Verbindungen, wie z. B. Acetanilid, Äthylisocyanid und Corticosteroide, die modi-

fizierte Typ II-Spektren auslösen, wobei das Absorptionsmaximum bei 420 nm, das Absorptionsminimum bei etwa 392 nm liegt. In diesen modifizierten Typ II-Spektren sehen SCHENKMAN et al., (1973) umgekehrte Typ I-Spektren.

Das Ausmaß der beobachteten spektralen Veränderungen zeigt eine deutliche Abhängigkeit sowohl von der Art und Konzentration des zugegebenen Substrates, als auch von der vorliegenden mikrosomalen Proteinkonzentration (NARASIMHULU et al., 1965; REMMER et al., 1966; SCHENKMAN et al., 1967). Eine graphische Darstellung der Absorptionsänderung bei einer bestimmten Wellenlänge in Abhängigkeit von der zugegebenen Substratmenge ergibt eine hyperbelförmige Titrationskurve (NARASIMHULU et al., 1965; SCHENKMAN et al., 1967), was auf eine direkte Bindung des Substrates an das mikrosomale Cytochrom P-450 schließen läßt (COOPER et al., 1965; SCHENKMAN et al., 1967). In Analogie zur doppeltreziproken Darstellung enzymatischer Aktivitäten als Funktion der Substratkonzentration findet sich auch für spektrale Änderungen eine lineare Abhängigkeit von der Substratkonzentration in der LINEWEAVER-BURK-Darstellung. FASCO et al. (1977) machten darauf aufmerksam, daß eine biphasische Abhängigkeit der spektralen Veränderungen von der Substratkonzentration besteht, die besonders bei hohen Substratkonzentrationen einen nicht-linearen Verlauf im doppeltreziproken LINEWEAVER-BURK-Diagramm erkennen läßt. Die spektrale Dissoziationskonstante K_s , definiert als diejenige Substratkonzentration, die eine halbmaximale spektrale Veränderung hervorruft, läßt sich - analog zur MICHAELIS-Konstante - aus dem Schnittpunkt der gewonnenen Gerade mit der Abszisse ermitteln. FASCO et al. (1977) gaben aus den oben erläuterten Gründen zwei K_s - Werte an (vgl. Diskussion).

Für eine Reihe von Substanzen, z. B. Hexobarbital und Amidopyrin, konnte eine Übereinstimmung der enzymatisch bestimmten MICHAELIS-Konstante K_M mit der spektrophotometrisch bestimmten spektralen Dissoziationskonstante K_S nachgewiesen werden (SCHENKMAN et al., 1967), was einer direkten Korrelation zwischen Bindung und Umsatz entsprechen würde. GILLETTE und GRAM (1969) sehen die spektralen Veränderungen als sichtbare "Michaeliskomplexe" an. Eine fehlende Übereinstimmung der beiden Konstanten bei anderen Substraten, wie z. B. Anilin, läßt darauf schließen, daß eine solche Korrelation nicht für alle Substrate gilt (SCHENKMAN et al., 1967).

Das charakteristische Aussehen der oxydativen Differenzspektren läßt sich mit Hilfe des Absolutspektrums des Cytochrom P-450 erklären (REMMER et al., 1969): Nach Zugabe von Hexobarbital, einem typischen Typ I-Substrat, beobachtet man eine Verschiebung des Absolutspektrums in Richtung kürzerer Wellenlängen, wobei sich das Absorptionsmaximum von 420 nm nach 415 nm bewegt. Im Gegensatz hierzu verursacht Anilin als Typ II-Substrat eine Verschiebung des Absolutspektrums in die entgegengesetzte Richtung. Das Absolutspektrum wandert hier von 420 nm nach 426 nm. Aus der Differenz der jeweiligen Absolutspektren ergeben sich theoretische Differenzspektren, welche mit den tatsächlich registrierten Differenzspektren gut übereinstimmen (KAHL und KAHL, 1981).

Über die Ursachen für das Entstehen spektraler Veränderungen sowie über die Natur der Bindungsstellen bestehen heute noch keine einheitlichen Vorstellungen. Nach IMAI und SATO (1967 a) werden Absorptionsveränderungen, die mit der Bindung von Substraten an mikrosomales Cytochrom P-450 einhergehen, durch eine Veränderung der Proteinkonformation hervorgerufen. SCHENKMAN et al. (1967) diskutieren eine Modifizierung der Hämoprotein-Liganden-Wechselbe-

ziehung, die zu einer Veränderung des molaren Extinktionskoeffizienten führt, wofür in der Tat EPR -spektroskopische Befunde sprechen (CAMMER et al., 1966).

Wie zu Beginn der Einleitung betont wurde, spielt die Eliminationsgeschwindigkeit, hierbei insbesondere die Biotransformationsgeschwindigkeit, für die Wirksamkeit und Wirkungsdauer eines Arzneimittels eine entscheidende Rolle. Durch gleichzeitige Verabreichung verschiedener Arzneimittel, aber auch durch Umweltgifte wie Insektizide, Herbizide, Nahrungsmittelzusätze und karzinogene Kohlenwasserstoffe, kann es einerseits zu einer Enzyminduktion mit daraus folgender Beschleunigung der Abbaugeschwindigkeit, andererseits zu einer Enzyminhibition mit nachfolgender Verlangsamung des Arzneimittelabbaues kommen. Dies kann, wie zahlreiche klinische Beobachtungen zeigen, zu schwerwiegenden Komplikationen und Intoxikationserscheinungen führen. Besonders betroffen sind hierbei Arzneimittelgruppen, die nur eine geringe therapeutische Breite besitzen, wie z. B. Antikonvulsiva, orale Antidiabetica und Antikoagulantien, auf die unten noch besonders eingegangen werden soll (ANDERS, 1973; KAHL, 1978).

Zunächst sollen die Mechanismen, die der Enzyminduktion bzw. der Enzyminhibition zugrunde liegen, ausführlicher dargestellt werden.

Die hydroxylierende Aktivität mikrosomaler Enzymsysteme der Leber kann durch Zufuhr zahlreicher Arzneimittel und Fremdstoffe in beträchtlichem Maße gesteigert werden. Dieses mit einer adaptiven Enzymvermehrung einhergehende Phänomen der Aktivitätssteigerung wird als Enzyminduktion bezeichnet und wurde erstmals von CONNEY et al. (1956) beschrieben. Er wies die induzierende Wirkung polycyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe, wie z. B.

3-Methylcholanthren (3-MC) oder 3,4-Benzpyren (3,4-BP), auf Arzneimittelhydroxylasen nach. Wenig später konnte REMMER (1959 a + b) eine Verkürzung der Hexobarbital-schlafzeit nach Phenobarbitalvorbehandlung beobachten, welche ebenfalls auf einer Enzyminduktion beruhte. Inzwischen sind mehr als 200 Arzneimittel, Insektizide, karzinogene Kohlenwasserstoffe und zahlreiche andere Fremdstoffe bekannt, welche zur Enzyminduktion befähigt sind (CONNEY, 1967; KUNTZMANN, 1969). Charakteristisch für alle diese Substanzen ist ihre gute Lipoidlöslichkeit, die ihre Anreicherung in den Fettdets und damit ihre lange Verweildauer im Organismus erklärt.

Eine Enzyminduktion erfolgt nur nach in vivo-Verabreichung stimulierender Pharmaka, daher vermutet man, daß die Enzyminduktion u. a. auf einer verstärkten Proteinsynthese beruht. KRATZ und STAUDINGER (1967) fanden nach PB-Stimulierung, in geringerem Maße auch nach 3,4-BP-Stimulierung, eine Zunahme des Lebergewichtes, bedingt durch eine Leberzellhypertrophie, eine Steigerung des mikrosomalen Proteingehaltes und des spezifischen Gehaltes an Cytochrom P-450. REMMER et al. (1967) bestätigten eine substratinduzierte Zunahme des Cytochrom P-450-Gehaltes; daneben wurde auch eine Synthesesteigerung der NADPH-Cytochrom c-Reduktase gefunden (REMMER und MERKER, 1965; ERNSTER und ORRENIUS, 1965). Andererseits blockieren Ethionin (CONNEY et al., 1960), Puromycin (CONNEY und GILMAN, 1963; GELBOIN und BLACKBURN, 1964; ORRENIUS und ERNSTER, 1964) und Aktinomycin (GELBOIN und BLACKBURN, 1964; ORRENIUS und ERNSTER, 1964), welche als Inhibitoren der Proteinsynthese bekannt sind, den Induktionseffekt. Entsprechend der gesteigerten Proteinsynthese läßt sich ein vermehrter Aminosäureeinbau in mikrosomales Protein nachweisen (GELBOIN und SOKOLOFF, 1961); auch eine Zunahme der DNA-abhängigen RNA-Poly-

merase wurde beobachtet (GELBOIN et al., 1967).

Morphologisch äußert sich die Enzyminduktion in einer massiven Proliferation der glatten Membranen des endoplasmatischen Retikulums der Leberzelle (REMMER und MERKER, 1963; FOUTS und ROGERS, 1965). Eine Ausnahme machen hier allerdings die polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, wie z. B. 3-MC oder 3,4-BP, bei denen elektronenmikroskopisch kein oder nur ein geringer Effekt nachweisbar ist (FOUTS und ROGERS, 1965). Auch die Tatsache, daß die maximale enzymatische Aktivität nach Vorbehandlung mit einem Induktor aus der Gruppe der Arzneimittel und Insektizide, als deren Prototyp das PB angesehen wird, durch zusätzliche Gabe eines polycyclischen Kohlenwasserstoffes, wie z. B. 3-MC oder 3,4-BP, noch gesteigert werden kann und daß Eintritt und Verlauf der induktiven Wirkung bei beiden Gruppen sehr unterschiedlich sind (CONNEY et al., 1956 u. 1960), lassen verschiedene Mechanismen bei der Enzyminduktion vermuten.

Bei der Enzyminhibition liegt in der Regel eine Konkurrenz zweier oder mehrerer Arzneimittel um die Bindung an das Cytochrom P-450 vor; sie führt zu einer Verlangsamung der Abbaugeschwindigkeit von Arzneimitteln bei der Biotransformation. Zur kompetitiven Inhibition sind selbst Substanzen mit völlig anderer chemischer Struktur in der Lage, wie z. B. einer der zuerst entdeckten Inhibitoren, das β -Diethylaminoethyl-diphenylpropylacetat (SKF 525-A) (ROGERS und FOUTS, 1964). Elektronenoptisch konnten strukturelle Veränderungen des endoplasmatischen Reticulums in der Leberzelle, die durch diesen Inhibitor verursacht waren, nachgewiesen werden (FOUTS und ROGERS, 1965). Viele strukturell dem SKF 525-A verwandte Substanzen, aber auch verschiedene andere Pharmaka, wie z. B. Metyrapon, dessen inhibitorische Wirkung besonders einge-

hend im Tierexperiment untersucht wurde (NETTER et al., 1967), sind zur Hemmung mikrosomaler Fremdstoffhydroxylasen in der Lage.

Wie oben schon kurz angedeutet wurde, hat die gegenseitige Beeinflussung des Arzneimittelabbaues besondere Bedeutung für die Antikoagulantientherapie erlangt. Auf Grund ihrer verbreiteten Anwendung als Langzeittherapeutica, ihrer geringen therapeutischen Breite und der exakten Überprüf- und Messbarkeit ihrer Wirkung haben die Cumarinantikoagulantien geradezu Modellcharakter für die Erforschung von Arzneimittelwechselbeziehungen erhalten (KOCH-WESER und SELLERS, 1971).

Bevor über mögliche Arzneimittelinteraktionen bei der Antikoagulantientherapie gesprochen wird, sollen noch einige Anmerkungen zum Metabolismus der 4-Hydroxy-Cumarinantikoagulantien gemacht werden. Auch die Cumarine werden wie viele andere lipophile Arzneimittel und Fremdstoffe durch ein in der Leber vorhandenes mikrosomales Enzymsystem metabolisiert (IKEDA et al., 1968; LEWIS et al., 1970). KRATZ und STAUDINGER konnten bereits 1965 nachweisen, daß Cytochrom P-450 an der Cumarinhydroxylierung beteiligt ist. In einer Übersichtsarbeit berichtete FEUER (1974) über den Metabolismus der Cumarine. Im einzelnen wurde besonders der Warfarin-metabolismus unter Berücksichtigung seiner R- und S-Enantiomere erforscht (TOWNSEND et al., 1975; POHL et al., 1976 und 1977; FASCO et al., 1978; KAMINSKY et al., 1979 und 1980 a sowie MacDONALD et al., 1981). Untersuchungen über den Metabolismus von Dicoumarol wurden besonders von CHRISTENSEN (1972) sowie von LEE et al., (1976) und THONNART et al., (1977) durchgeführt. Über den Metabolismus von Phenprocoumarol berichteten HADOCK et al., (1975), POHL et al., (1975) und aus unserem Institut

JÄHNCHEN et al. (1976 a) und SCHMIDT et al. (1980). Schließlich wurden in jüngster Zeit auch Untersuchungen über den Metabolismus von Acenocoumarol veröffentlicht (DIETERLE et al., 1977; THIJSEN et al., 1982). Übereinstimmend berichten alle Autoren über eine Ringhydroxylierung der Cumarine, die unter Beteiligung der mischfunktionellen Cytochrom P-450 abhängigen Oxidase in der Leber stattfindet.

Im Folgenden sollen Arzneimittelwechselwirkungen bei der Antikoagulantientherapie aufgezeigt werden. Ausführliche Darstellungen hierüber finden sich in der Literatur von GLOGNER (1970), KOCH-WESER und SELLERS (1971 a + b, 1973 und 1978), GUGLER und DENGLE (1973), KAHL (1971 und 1978), HELD et al. (1977), HELD (1980), HANSTEN (1979) sowie AHMAD (1980).

Grundsätzlich sind vier mögliche Wechselwirkungen bei der Antikoagulantientherapie denkbar. Der Abbau der Cumarinderivate kann sowohl im Sinne einer Induktion, als auch einer Inhibition durch andere Arzneimittel beeinflusst werden. Andererseits können aber auch Cumarinderivate selbst als Induktoren bzw. Inhibitoren des Arzneimittelstoffwechsels fungieren.

Bei der Induktion führt eine Steigerung der Enzymaktivität beim Cumarinmetabolismus über eine gesteigerte Abbaugeschwindigkeit zu einer klinisch in Erscheinung tretenden Verringerung der gerinnungshemmenden Antikoagulantienwirkung. So konnte z. B. beobachtet werden, daß bei gleichzeitiger Antikoagulantientherapie mit Warfarin die zusätzliche Verabreichung von Phenobarbital eine erhebliche Steigerung der Erhaltungsdosis erforderlich machte, um die gerinnungshemmende Cumarinwirkung aufrechtzuerhalten (ROBINSON, MacDONALD, 1966). Umgekehrt lassen sich zahlreiche Blutungszwischenfälle unter Anti-

Tabelle 1 Arzneimittel, die den mikrosomalen Abbau von
4-Hydroxycoumarinantikoagulantien stimulieren
(modifiziert nach HANSTEN, 1979).

Induzierendes Arzneimittel	Induzierter Stoffwechsel	Literatur
Phenobarbital	Dicoumarol	CUCINELL (1965) GROSS, DICKHAUS (1965) CORN (1966) LAI et al. (1976)
	Warfarin	ROBINSON, Mc DONALD (1966) Mc DONALD, ROBINSON (1968) Mc DONALD et al. (1967 u. 69)
Heptabarbital	Dicoumarol	AGGELER, O'REILLY (1969) DAYTON et al. (1961)
	Ethylbiscoum.	AVELLANEDA (1955) DAYTON et al. (1961)
	Acenocoumarol	DAYTON et al. (1961)
Amobarbital	Warfarin	ROBINSON, SYLVESTER (1970)
	Ethylbiscoum.	AVELLANEDA (1955)
Butabarbital	Warfarin	ANTLITZ et al. (1968)
	Phenprocoum.	ANTLITZ et al. (1968)
Barbital	Dicoumarol	DAYTON et al. (1961)
	Ethylbiscoum.	DAYTON et al. (1961)
	Acenocoumarol	DAYTON et al. (1961)
Carbamazepin	Warfarin	HANSEN et al. (1971 b)
Chloralhydrat	Dicoumarol	CUCINELL et al. (1966)
	Warfarin	Mc DONALD et al. (1967)
	Warfarin	UDALL (1974 u. 1975 b)
Glutethimid	Warfarin	Mc DONALD et al. (1967) Mc DONALD et al. (1969) UDALL (1975 a + b)
Griseofulvin	Warfarin	CULLEN, CATALANO (1967) UDALL (1970)

Fortsetzung Tabelle 1

Induzierendes Arzneimittel	Induzierter Stoffwechsel	Literatur
Haloperidol	Dicoumarol Warfarin	OAKLEY, LAUTCH (1963) OAKLEY, LAUTCH (1963)
Metaqualon	Warfarin	UDALL (1975)
Phenytoin	Dicoumarol	HANSEN et al. (1971 a)
Rifampicin	Warfarin Phenprocoum.	RAMANKIEWICZ (1975) O'REILLY (1975) SELF et al. (1975) BOEKHOUT-MUSSERT et al. (1974)
Sulphamethoxazol	Warfarin	TILSTONE (1977)

koagulantientherapie auf das Nachlassen einer induktiven Wirkung (MacDONALD, ROBINSON, 1968) auf den Cumarinabbau zurückführen. Eine Reihe von Arzneimitteln, die den mikrosomalen Abbau von 4-Hydroxy-Cumarinantikoagulantien stimulieren, sind in einer Übersicht tabellarisch zusammengefaßt (Tab. 1).

Im Gegensatz zu den Enzyminduktoren stehen Pharmaka, welche die Biotransformation von Cumarinantikoagulantien hemmen, die sogenannten Enzyminhibitoren (Tab. 2). Bei gleichzeitiger Verabreichung eines solchen Enzyminhibitors im Laufe einer Antikoagulantientherapie kommt es zu einer Erhöhung des Cumarinplasmaspiegels und damit zu einer Potenzierung der antikoagulativen Wirkung. Zahlreiche Beispiele für die Inhibition des Cumarinantikoagulantienabbaues wurden beschrieben; so konnte u. a. ein Hemmeffekt für Phenyramidol (SOLOMON und SCHROGIE, 1966), Chloramphenicol (CHRISTENSEN und SKOVSTED, 1969), Nortriptylen und Allopurinol (VESELL et al., 1970) auf den Dicoumarolabbau

Tabelle 2 Arzneimittel, die den mikrosomalen Abbau von 4-Hydroxy-Cumarinantikoagulantien beim Menschen hemmen. (modifiziert nach HANSTEN, 1979).

Hemmendes Arzneimittel	Gehemmter Stoffwechsel	Literatur
Allopurinol	Dicoumarol Phenprocoum.	VESELL et al. (1970) JÄHNCHEN et al. (1977 a)
Benzydaron	Cumarine	VERSTRAETE et al. (1968)
Chinidin	Warfarin	GAZZANIGA, STEWART (1969)
Chloramphenicol	Dicoumarol Phenprocoum.	CHRISTENSEN, SKOVSTED (1969) JÄHNCHEN, MEINERTZ (1977)
Chlortetracyclin	Cumarine	PETERS, FOUTS (1969)
Clofibrat	Warfarin	HUNNINGHAKE, AZARNOFF (1968) BJÖRNSON et al. (1977)
Cotrimoxazol	Warfarin	LETTER (1975) HANSEN et al. (1975)
Dextrapropoxyph.	Warfarin	ORME (1976)
Disulfiram	Warfarin	ROTHSTEIN (1968 u. 1972) O'REILLY (1971 u. 1973)
Methylphenidat	Ethylbiscoum.	GARRETSON et al. (1969) HAGUE et al. (1971)
Methyltestosteron	Phenprocaum.	HUSTED et al. (1976)
Metronidazol	Warfarin	O'REILLY (1976) KAZMIER (1976)
Paracetamol	Cumarine	ANTLITZ et al. (1968 a)
Phenylbutazon	Warfarin	LEWIS et al. (1974)
Phenylramidol	Dicoumarol Warfarin	SOLOMON, SCHROGIE (1966) CARTER (1965) CARTER (1965)

Tabelle 3 Hemmung des mikrosomalen Arzneimittelabbaus
beim Menschen durch 4-Hydroxy-Cumarinanti-
koagulantien (modifiziert nach HANSTEN, 1979)

Hemmendes Cumarin	Gehemmter Stoffwechsel	Literatur
Dicoumarol	Chlorpropamid	KRISTENSEN, HANSEN (1968)
Dicoumarol	Phenytoin	HANSEN et al. (1966) SKOVSTED et al. (1976)
Dicoumarol	Phenobarbital	LAUNGBURRY (1966)
Dicoumarol	Tolbutamid	KRISTENSEN et al. (1967) SOLOMON, SCHROGIE (1967) SPURNY et al. (1965) SKOVSTED et al. (1976) JÄHNCHEN et al. (1976 b)

nachgewiesen werden. Phenyramidol hemmt zusätzlich den Warfarinmetabolismus (CARTER, 1965). Wie klinische Beobachtungen zeigten, kam es bei Patienten, die unter anti-koagulativer Langzeittherapie standen, bei gleichzeitiger Phenyramidolmedikation innerhalb von drei Tagen zu einer erheblichen Steigerung der gerinnungshemmenden Wirkung. Inzwischen wurden, meist auf Grund klinischer Beobachtungen, zahlreiche Arzneimittel gefunden, bei denen sich ein inhibitorischer Effekt auf den Abbau von Cumarinderivaten zeigen ließ. Eine Zusammenstellung enthält Tabelle 2.

Obwohl 36 coumarinartige Verbindungen fähig sind, Cumarinhydroxylasen o. a. Fremdstoffhydroxylasen zu induzieren (FEUER, 1970), konnte dies für antikoagulativ wirksame 4-HCD klinisch nicht nachgewiesen werden; die zur Induktion erforderlichen Dosen würden am Patienten bereits zu Blutungszwischenfällen führen.

Cumarinderivate sind hingegen durchaus in der Lage, den Abbau anderer Arzneimittel zu inhibieren. Bekannt ist die Hemmung des Diphenylhydantoinabbaues durch Dicoumarol (HANSEN et al., 1966) oder die Potenzierung der Tolbutamidwirkung durch Dicoumarol (KRISTENSEN et al., 1967); so kam es bei gleichzeitiger Dicoumarolbehandlung zu einer Verlängerung der Tolbutamidhalbwertszeit mit Anstieg des Tolbutamidblutspiegels und daraus resultierend zu hypoglykämischen Zuständen bei diabetischen Patienten (KRISTENSEN et al., 1967). In Tabelle 3 sind klinische Beispiele für die Hemmung des mikrosomalen Arzneimittelabbaues beim Menschen durch 4-OH-Cumarinantikoagulantien zusammengefaßt.

Tierexperimentell wurde die Hemmung der Modellreaktionen wie Anilinhydroxylierung, Amidopyrindemethylierung und p-Nitroanisol-O-Demethylierung durch 4-HCD bisher von CHRISTENSEN und WISSING (1972) in vitro untersucht. DECKERT und REMMER (1972) konnten für Warfarin eine inhibitorische Wirkung auf die Anilinhydroxylierung und die Amidopyrindemethylierung nachweisen. In unserem Institut wurde die Wirkung von Cumarin selbst und verschiedener nicht blutgerinnungshemmender Derivate auf die Aktivität mikrosomaler Fremdstoffhydroxylasen untersucht (MEIS, 1973). Dies führte uns zu der Frage, ob und in welchem Ausmaß der oxydative mikrosomale Arzneimittelstoffwechsel durch antikoagulativ wirksame 4-HCD gehemmt wird, was am Beispiel der pNA-Demethylierung unter Verwendung PB-stimulierter Rattenlebermikrosomen untersucht wurde. Darüberhinaus interessierte uns insbesondere die Bindung der 4-HCD an oxydiertes Cytochrom P-450 und die dabei zu beobachtenden spektralen Erscheinungen. Ein Teil der Ergebnisse wurde bereits in einem Kongreßvortrag vorgestellt (HÜTHWOHL et al., 1972).

ZIEL DER ARBEIT

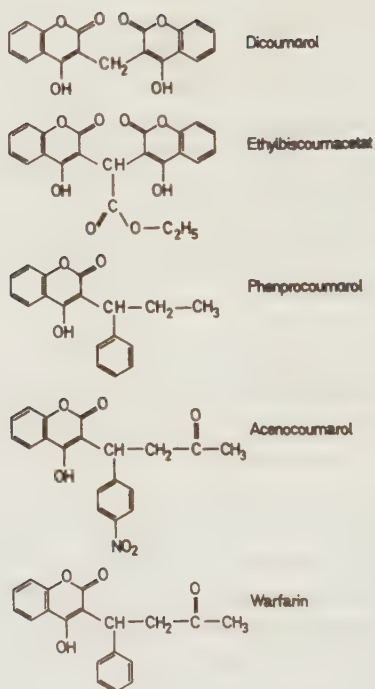


Abb. 1

Strukturformeln der verwendeten 4-Hydroxy-Cumarinanti-koagulantien

In dieser Arbeit sollen in vitro-Untersuchungen zur Frage der Interaktion antikoagulativ wirksamer 4-Hydroxy-Cumarinderivate mit Cytochrom P-450 an phenobarbitalstimulierten Rattenlebermikrosomen vorgelegt werden. Bei den verwendeten Antikoagulantien, deren Strukturformeln in Abb. 1 dargestellt sind, handelt es sich um die als

Dicumarine bezeichneten Substanzen Dicoumarol und Ethylbiscoumacetat und um die als Monocumarine eingruppierten Verbindungen Phenprocoumarol, Acenocoumarol und Warfarin.

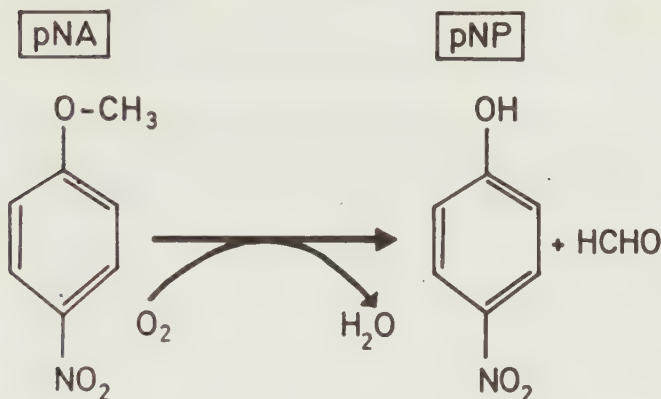


Abb. 2

Schematische Darstellung der pNA-O-Demethylierung

Am Beispiel einer Modellreaktion, der O-Demethylierung von p-Nitroanisol (pNA) zu p-Nitrophenol (pNP), welche in Abb. 2 schematisch dargestellt ist, soll zunächst enzymkinetisch untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß der oxydative mikrosomale Arzneimittelmetabolismus durch Anwesenheit antikoagulativ wirksamer 4-HCD inhibiert wird.

Es schließen sich spektralanalytische Untersuchungen zur Bindungscharakteristik von 4-HCD an Cytochrom P-450 innerhalb oxydiert gehaltener Mikrosomensuspensionen an. Hierzu werden oxydative Differenzspektren der verschiedenen 4-HCD registriert. Eine Klassifizierung der

4-HCD auf Grund ihrer spektralen Eigenschaften wird vorgenommen. Zur Frage der Affinität zwischen Cytochrom P-450 und den verwendeten 4-HCD wird die Abhängigkeit des Ausmaßes spektraler Veränderungen von der Substratkonzentration im oxydativen Differenzspektrum geprüft und zur Bestimmung der spektralen Dissoziationskonstanten (K_s) quantitativ ausgewertet.

Abschließend soll der Frage nachgegangen werden, ob eine Korrelation besteht zwischen inhibitorischer Wirkung durch 4-HCD und Affinität zum Cytochrom P-450.

B) METHODEN

1. Herstellung der Mikrosomenfraktion

a) Phenobarbitalvorbehandlung der Tiere

Sämtliche Untersuchungen wurden in vitro an Rattenlebermikrosomen durchgeführt. Die Vorbehandlung der 150 bis 200 g schweren männlichen Sprague-Dawley-Ratten erfolgte an drei aufeinanderfolgenden Tagen durch intraperitoneale Injektion von 80 mg Phenobarbital-Natrium/kg Körpergewicht in einem Volumen von 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung. Den Ratten stand bis etwa 12 Stunden vor der Tötung Altromin^R-Trockenfutter (Fa. Altromin, Lage/Lippe) und Wasser ad libitum zur Verfügung.

b) Gewinnung und Aufbereitung der Lebermikrosomen

Die Ratten wurden 20 bis 24 Stunden nach der letzten Phenobarbital-Natrium-Injektion durch Genickdislokation getötet und nach Durchtrennung der Halsgefäße gut ausgeblutet. Nach Freilegung der Baucheingeweide wurden die Lebern in situ über eine in der Pfortader befindliche Kanüle 2 bis 3 Minuten lang mit einer eiskalten 0,9 %igen NaCl-Lösung perfundiert, um möglichst viele Erythrocyten herauszuwaschen. Anschließend wurden die Lebern entnommen, gewogen, auf das dreifache Gewicht mit SVT-Lösung (Saccharose 0,25 M, Versen 0,005 M, Tris-Puffer 0,02 M, pH mit HCL auf 7,4 eingestellt) nach LEYBOLD und STAUDINGER (1959) aufgefüllt und im Kälteraum bei 4° C mit einem Ultraturaxhomogenisator (Fa. Jahnke) homogenisiert. Das Homogenat wurde dann 15 Minuten lang bei 1500 x g und danach weitere 30 Minuten lang bei 9000 x g in

einer Sorvall-Zentrifuge, Modell RC2-B, zur Entfernung von Zelltrümmern und Mitochondrien zentrifugiert. Der 9000 x g - Überstand wurde darauf in einer Spinco-Ultrazentrifuge vom Typ L 2 65 B (Fa. Beckmann) bei 105 000 x g 60 Minuten lang zentrifugiert. Das Sediment wurde in SVT-Lösung resuspendiert und erneut bei 105 000 x g eine Stunde lang zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Schließlich wurde nach der dritten Ultrazentrifugation bei 105 000 x g der in SVT-Lösung resedimentierte Niederschlag zur weiteren Aufbewahrung auf mehrere Reagenzgläser verteilt und bei -15°C eingefroren.

c) Bestimmung des Proteingehaltes der Mikrosomen und Aufteilung der Mikrosomenfraktionen

Der Proteingehalt der Mikrosomen wurde nach der Methode von LOWRY et al. (1951) bestimmt. Als Standard diente hierbei Lab-Trol^R (Dade Reagents Inc., U.S.A.). Nach Kenntnis des Eiweißgehaltes wurde zu Beginn einer Versuchsserie jeweils eine Mikrosomenportion (ca. 2 ml) langsam im Eisbad aufgetaut, nach etwa 40 Minuten mit einem Glasspatel sorgfältig durchmischt und anschließend in 10 bis 15 kleinere, je 5 mg Proteingehalt entsprechende, Fraktionen aufgeteilt. Die Proben wurden bei -15°C erneut eingefroren. Erst unmittelbar vor Beginn eines Versuches wurde der Inhalt eines Reagenzglases mit der für einen Versuchsansatz berechneten Mikrosomenmenge 5 Minuten lang im Eisbad aufgetaut. Eine durch unterschiedlich lange Auftauzeiten bedingte unterschiedliche Alterung bzw. enzymatische Aktivität der Mikrosomen konnten durch diese Standardisierung vermieden werden.

2. Photometrische Messungen der p-Nitroanisol-Demethylierung

a) Prinzip

Das Modellsubstrat p-Nitroanisol (pNA) wird unter Anwesenheit von Mikrosomen, NADP sowie eines NADPH- regenerierenden Systems enzymatisch zu p-Nitrophenol (pNP) abgebaut. Dabei handelt es sich um eine Reaktion vom Typ der oxydativen O-Demethylierung. Das entstehende Demethylierungsprodukt pNP wurde auf Grund seiner gelben Farbe spektrophotometrisch in Abwandlung der nach NETTER und SEIDEL (1964) beschriebenen Methode bestimmt (LIER, 1972). Die zeitliche Extinktionsänderung, ein Maß für die Bildungsgeschwindigkeit des pNP, wurde nach Zugabe verschiedener 4-Hydroxy-Cumarinderivate (4-HCD) bzw. ihres Lösungsmittels (NaOH) bei Kontrollversuchen gemessen.

b) Geräte

Die photometrischen Messungen wurden am Spektralphotometer Beckman DB-GT bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt (LIER, 1972). Der Küvettenkasten wurde mit Hilfe eines Thermostaten (Fa. Lauda) so temperiert, daß die Temperatur in den Küvetten konstant 30° C betrug. Der zeitliche Verlauf der Extinktionszunahme wurde von einem Rikadenki-Schreiber (Rikadenki-Schreiber B-104) registriert. Die pH-Messungen wurden mit einer Glaselektrode (Fa. Schott, Mainz) an einem Digitalmeter (DIGI 610) vorgenommen.

c) Ansetzen der Lösungen und Inkubationsbedingungen

Von den zu untersuchenden 4-Hydroxy-Cumarinderivaten

Dicoumarol (Dicumarol^K), Ethylbiscoumacetat (Tromexan^R), Phenprocoumarol (Marcumar^R), Acenocoumarol (Sintrom^K) und Warfarin (Coumadin^R) wurden 25 mM Lösungen hergestellt, als Lösungsmittel diente 0,1 N NaOH, mit welcher auch die Kontrollen durchgeführt wurden. 0,067 M Sörensen-Phosphatpuffer wurde auf ein pH von 7,85 eingestellt. Zur Herstellung einer 2×10^{-3} M Lösung wurden 15,3 mg p-NA in 50 ml Sörensen-Phosphatpuffer (pH 7,85) unter leichtem Erwärmen gelöst. Das NADPH-regenerierende System bestand aus Glukose-6-Phosphat (G-6-P), Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH) und Nicotinamidadeninucleotidphosphat (NADP). Außerdem enthielten unsere Ansätze Nicotinsäureamia (Niacin). Die dadurch verursachte leichte Verlangsamung der Reaktion nahmen wir zu Gunsten eines linearen Reaktionsverlaufes über etwa 10 Minuten in Kauf. Es wurden 60 mg G-6-P und 122 mg Niacin gemeinsam in 6ml Sörensen-Phosphatpuffer (pH 7,85) gelöst. G-6-P-DH lag als 1 mg/ml Suspension (Fa. Boehringer, Mannheim) vor, ihre enzymatische Aktivität betrug 140 U/ml. Zur Herstellung einer NADP-Lösung wurden 30 mg β -NADP in Form des Dinatriumsalzes in 0,4 ml Aqua bidest. aufgelöst. Alle angesetzten Lösungen, mit Ausnahme des pNA, wurden im Eisbad gekühlt aufbewahrt.

d) Versuchsablauf

Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde eine 5 mg Protein entsprechende Mikrosomenmenge 5 Minuten lang im Eiswassersbad aufgetaut. Danach wurde mit 0,4 ml G-6-P-Niacin-Gemisch, 0,02 ml G-6-P-DH, 0,25 ml pNA 2×10^{-3} M und 4,33 ml Sörensen-Phosphatpuffer 0,067 M (pH 7,8) ein 5 ml Ansatz hergestellt. Anschließend wurde dieser Doppelansatz mit Hilfe eines Reagenzglasvibrators sorgfältig durchgemischt und zu gleichen Teilen auf zwei Küvetten verteilt. Die Substanzen lagen dabei in einem Volumen von 2,5 ml pro Küvette in folgenden Konzentren-

trationen vor: Protein 1 mg/ml, G-6-P 3,1 mM, G-6-P-DH 0,56 U/ml, Niacin 13,3 mM und pNA 0,1 mM.

Eine Küvette wurde bis zum Beginn des zweiten Versuches weiter im Eisbad gekühlt, während die andere als Meßküvette im Küvettenkasten des Spektralphotometers Beckman DB-GT bei 30° C 5 Min. lang äquilibriert wurde. In der Referenzküvette befand sich eine schwach gelbliche Pikrinsäurelösung, die diente einem groben optischen Abgleich zwischen beiden Küvetten. Der genaue optische Abgleich zwischen Meß- und Referenzküvette wurde mit Hilfe der Nullpunktunterdrückung des Spektralphotometers vorgenommen. Der Zeiger des Photometers wurde allerdings kurz vor dem Ende der Äquilibrierungszeit nicht genau auf den Nullpunkt eingestellt, sondern auf einen Wert von 0,1 Extinktionseinheiten, um die zu Beginn der Reaktion zu beobachtende Extinktionsabnahme mitzuerfassen.

Der Start der Reaktion erfolgte durch Einmischen von 10 Mikroliter NADP, was einer Enkonzentration von 0,4 mM entsprach. Zur Volumenaemessung wurde eine 10 Mikroliter-Pipette benutzt. Das Zugabevolumen wurde auf einen Glaspatel aufgebracht und 15 Sekunden lang sorgfältig in die Meßküvette eingerührt. Unmittelbar danach wurden Spektralphotometer und Mikadenki-Schreiber gestartet. Der Reaktionsverlauf, erkennbar an einer stetigen Extinktionszunahme, wurde in den nun folgenden 3 Minuten fortlaufend registriert. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Schichtdicke von 1 cm. Bei einem Meßbereich von 1 A und einer am Schreiber eingestellten Verstärkung von 50 mV entsprach die gesamte Schreiberbreite einer Extinktion von 0,5 Extinktionseinheiten. Die Aufzeichnung erfolgte mit einer Registriergeschwindigkeit von 10 mm/Min.

Nach drei Minuten Laufzeit wurden ebenfalls mit Hilfe eines Plastikspatels 10 Mikroliter eines 4-Hydroxy-Cumarinderivates, einer Endkonzentration des Inhibitors von 0,1 mM entsprechend, zugegeben. Bei den Kontrollen erfolgte in gleicher Weise die Zugabe von 10 Mikroliter 0,1 N NaOH. Auch der Reaktionsverlauf nach Zugabe eines Inhibitors bzw. des Lösungsmittels in der Kontrolle wurde über einen Zeitraum von drei Minuten registriert. Danach wurden Schreiber und Spektralphotometer gestoppt und zur Durchführung eines weiteren Versuches, wie oben beschrieben, vorbereitet.

Anschließend wurde die zweite bereits vorbereitete Küvette aus dem Eisbad genommen, im Küvettenkasten äquilibriert und, wie oben beschrieben, mit NADP gestartet. Wieder wurde nach drei Minuten eines der 4-HCD bzw. 0,1 N NaOH zugegeben. Dem Zugangsmodus lag ein vorher festgelegtes permutierendes Schema zugrunde, wonach in sechs aufeinanderfolgenden Versuchen jeweils eines der fünf Cumarinderivate oder 0,1 N NaOH als Kontrolle untersucht wurde. Die Mikrosomen entstammten zwei unabhängigen Präparationen vom 24.5.71 und 8.6.71. Es wurden insgesamt 15 Versuchsserien bestehend aus je 6 Einzeluntersuchungen mit variabler Reihenfolge durchgeführt.

e) p-Nitrophenol-Eichkurve

Um aus der gemessenen zeitlichen Extinktionsänderung die entstandene p-Nitrophenolmenge zu berechnen, fertigten wir eine Eichkurve für pNP an. Wie aus Abb. 3 zu sehen ist, bestand in dem gewählten Konzentrationsbereich von $1,25 \times 10^{-6}$ M bis 4×10^{-5} eine lineare Abhängigkeit der gemessenen Extinktion bei 405 nm von der vorhandenen p-Nitrophenolkonzentration. Die Anwendung des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes, welches besagt, daß die Extinktion proportional der Konzentration und der Schichtdicke ist ($E = c \times d \times \epsilon$), erlaubte daher die Bestimmung

des molaren Extinktionskoeffizienten. Er ergibt sich aus der Steigung der p-Nitrophenol-Eichkurve (Abb. 3) und betrug in unseren Versuchen $14 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{ Mol}^{-1}$. Durch Auflösen der LAMBERT-BEERSchen Gleichung nach der Konzentration (c) ließ sich bei bekannter Schichtdicke ($d = 1 \text{ cm}$) ein Umrechnungsfaktor zur Berechnung der Substratumsätze bei den Versuchen zur pNA-Demethylierung ermitteln. Danach entsprach eine Extinktionseinheit einer entstandenen p-Nitrophenolmenge von 71,4 nMol pro mg Mikrosomen und Minute.

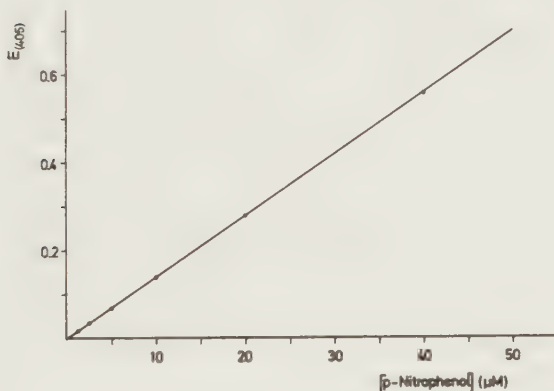


Abb. 3 p-Nitrophenol-Eichkurve. Abhängigkeit der bei 405 nm gemessenen Extinktion von der p-Nitrophenolkonzentration. Inkubationsbedingungen: Phenobarbitalstimulierte Rattenlebermikrosomen (Proteingehalt 1 mg/ml), Sörensen-Phosphatpuffer (pH 7,8), p-Nitrophenol $1,25 \times 10^{-6} \text{ M}$ bis max. $4 \times 10^{-5} \text{ M}$. Temperatur 30° C

3. Spektralanalytische Untersuchungen

a) Geräte

Zur Untersuchung der Bindungseigenschaften von 4-Hydroxy-Cumarinderivaten innerhalb oxydierter Mikrosomensuspensionen wurden Differenzspektren am Doppelwellenlängen-Spektralphotometer Aminco-Chance aufgenommen. Das Gerät befand sich dabei in der "split-beam"-Einstellung, die Spaltbreite betrug 1 mm. Die Temperierung wurde mit Hilfe einer Umwälzpumpe vorgenommen, so daß die in den Küvetten gemessene Temperatur 30° C betrug.

b) Vorbereitung

Unmittelbar vor Beginn eines Versuches wurde eine 5 mg Proteingehalt entsprechende Mikrosomenmenge aufgetaut. Dies geschah durch Zugabe von 0,067 M Sörensen-Phosphatpuffer (pH 7,4) von ca. 25° C bis zu einem Endvolumen von 5 ml. Nach sorgfältiger mechanischer Durchmischung mit Hilfe eines Reagenzglasvibrators wurde der Doppelansatz zu gleichen Teilen auf zwei Küvetten verteilt, von denen die eine ständig als Meß- und die andere als Referenzküvette benutzt wurde.

Bis zum Beginn der optischen und potentiometrischen Errichtung einer Basislinie gleicher Lichtabsorption zwischen Referenz- und Meßküvette wurden beide Küvetten im Küvettenkasten des Spektralphotometers fünf Minuten lang äquilibriert. Der Abgleich der Basislinie erfolgte über einen Wellenbereich von 350 bis 500 nm bei einer Empfindlichkeit von 0,05 Extinktionseinheiten für die volle Schreiberbreite. Um evtl. Alterungseffekte der Mikrosomen zu vermeiden, wurde die Errichtung der Basislinie stets innerhalb 5 bis 15 Min. abgeschlossen.

c) Versuchsablauf

Die Ermittlung oxydativer Bindungsspektren der 4-OH-Cumarinderivate (4-HCD) erfolgte durch kumulative Zugabe kleiner Volumina (2-10 Mikroliter) der betreffenden alkalischen Substanzlösung in die Meßküvette und entsprechender Volumina des Lösungsmittels (0,1 N NaOH) in die Referenzküvette. Die Abmessung wurde mit Hilfe einer Mikrospritze (Hamilton, 10 Mikroliter) vorgenommen. Dabei wurde das Zugabevolumen auf einen Plastikspatel aufgebracht und unter sorgfältigem Durchmischen der Mikrosomensuspension in die Meß- bzw. Referenzküvette eingebracht. Zwei Minuten später wurde die Aufnahme der Differenzspektren bei einer Schreibergeschwindigkeit von 2 nm/sec und einem Absorptionsbereich von 0,05 A für die volle Schreiberebreite begonnen.

Der gesamte Vorgang wurde so lange wiederholt, bis keine Erhöhung des spektralen Effektes mehr zu erreichen war. Dies war nach sechs bis acht Zugaben entsprechend insgesamt 28 bis 68 Mikroliter Substanz bzw. Lösungsmittel zu einem Ausgangsküvetteninhalt von 2,5 ml der Fall. Die Gesamtversuchsdauer bis zur letzten Zugabe betrug etwa vierzig bis fünfzig Minuten.

Bei Kontrollversuchen befand sich in beiden Küvetten je 2,5 ml Sörensen-Phosphatpuffer ohne Mikrosomen. Die Zugabe von Cumarinderivaten bzw. Lösungsmittel erfolgte in der oben beschriebenen Weise. Die registrierten Spektren zeigten die Eigenabsorption der 4-HCD in dem Wellenbereich von 350 bis 500 nm.

2. Quantitative Auswertung oxydativer Bindungsspektren

Die Änderung der optischen Dichte in der Meßküvette, bezogen auf die Referenzküvette, ist ein Maß für die spek-

trale Veränderung, die nach Zugabe von 4-Hydroxy-Cumarinderivaten zu einer Mikrosomensuspension auftritt.

Bei der Auswertung wurde die Differenz der optischen Dichte (Δ C.D.) zwischen einem Absorptionsmaximum bzw. -minimum bei 422 nm und einer Bezugswellenlänge von 490 nm gemessen (Abb. 6, 9 bzw. 14). Im Falle des Dicoumarol wurden die Absorptionsunterschiede zwischen dem Wellental bei etwa 429 nm und der Bezugswellenlänge bei 490 nm verglichen (Abb. 16). Die Bezugswellenlänge wurde in einem Bereich gewählt, in dem praktisch keine Eigenabsorption der 4-OH-Cumarinderivate mehr vorhanden war. Beim Acenocoumarol mußte allerdings die bei 422 nm ermittelte optische Dichte um den Betrag reduziert werden, der durch die in diesem Bereich noch relativ hohe Eigenabsorption bedingt war (Abb. 11 u. 12). Die Verschiebung der Basislinie, die während der Versuche zu beobachten war, wurde bei der Auswertung berücksichtigt.

4. Chemikalien

Die verwendeten Substanzen waren Handelspräparate von analytischem Reinheitsgrad. Cofaktoren und Enzyme waren Präparate der Fa. Boehringer & Söhne, Mannheim. Die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase für das NADPH-regenerierende System hatte den Reinheitsgrad II. Nicotinsäureamid, p-Nitroanisol, p-Nitrophenol und Pufferlösungen wurden von der Fa. E. Merck, Darmstadt, bezogen. Die 4-OH-Cumarinantikoagulantien Acenocoumarol und Ethylbiscoumacetat wurden von der Fa. Ciba-Geigy, Warfarin von der Fa. Iptor A.G., St. Ingoert, und Phenprocoumarol von der Fa. Hoffmann-La Roche, Grenzach, zur Verfügung gestellt; Dicoumarol wurde von der Fa. Schulerat, München, bezogen.

5. Statistische Auswertung

Die angegebenen Mittelwerte stellen das arithmetische Mittel ($\bar{X}$) von absoluten oder prozentual ausgedrückten Meßergebnissen dar. Als Maß für die Streuung dient, wenn nicht anders vermerkt, die Standardabweichung des Mittelwertes ($s_{\bar{X}}$). Die Regressionsgeraden wurden nach der Methode der kleinsten quadratischen Abweichung berechnet.

Eine statistische Auswertung der enzymkinetischen Meßergebnisse hinsichtlich signifikanter Unterschiede der inhibitorischen Potenz verschiedener 4-OH-Cumarinanti-coagulantien erfolgte mit Hilfe des FRIEDMAN-Testes als zweifacher Varianzanalyse (FRIEDMAN, 1937) bzw. des WILCOXON und WILCOX-Testes als multiplem Vergleich abhängiger Stichproben (WILCOXON und WILCOX, 1964).

Alle Berechnungen wurden maschinell auf einem Wang-Rechner " series 700 " nach Programmen des Pharmakologischen Instituts vorgenommen.

C) ERGEBNISSE

1. Hemmung der p-Nitroanisol-O-Demethylierung durch 4-OH-Cumarinanaloga

Unmittelbar nach dem Start der Reaktion durch Zugabe von NADP in die Meßküvette wurde eine Extinktionszunahme registriert, deren zeitlicher Verlauf etwa über einen Zeitraum von 8 Min. konstant war. Im weiteren Verlauf nahm die Extinktionsänderung pro Minute allmählich ab, bis schließlich die Reaktion nach 20 bis 25 Min. zum Stillstand kam und die Extinktion ihren Maximalwert erreicht hatte.

Wie in Kontrollversuchen (siehe Methoden: p-Nitrophenol-Dickkurve) durch Hinzufügen definierter Mengen p-Nitrophenol zu einem Mikrosomen enthaltenden Ansatz gezeigt wurde, besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen p-Nitrophenolkonzentration und gemessener Extinktion im Sinne des LAMBERT-BEERSchen Gesetzes. Es kommt also offenbar zu keiner Störung der Messungen durch eventuelle Absorption von p-Nitrophenol an mikrosomales Protein. Wir gingen daher davon aus, daß die bei der p-Nitroanisol-Demethylierung beobachtete Extinktionszunahme ausschließlich auf die Bildung von pNP zurückzuführen war.

In Abb. 4 a-f sind typische Kurvenverläufe einer Versuchsreihe zur Frage der Beeinflussung der pNA-Demethylierung durch 4-OH-Cumarinderivate, wie sie vom Rikadenki-Schreiber registriert wurden, im Original wiedergegeben. Entsprechend der Registrierichtung, die durch einen Pfeil verdeutlicht ist, kommt die bei 405 nm gemessene Extinktion auf der Ordinate zur Darstellung, während die Zeit nach Beginn der Demethylierungsreaktion auf der Abszisse abzulesen ist. Zum Zeitpunkt $t = 0$ Min. erfolgte jeweils der Start der Reaktion durch Zugabe von NADP. Man erkennt

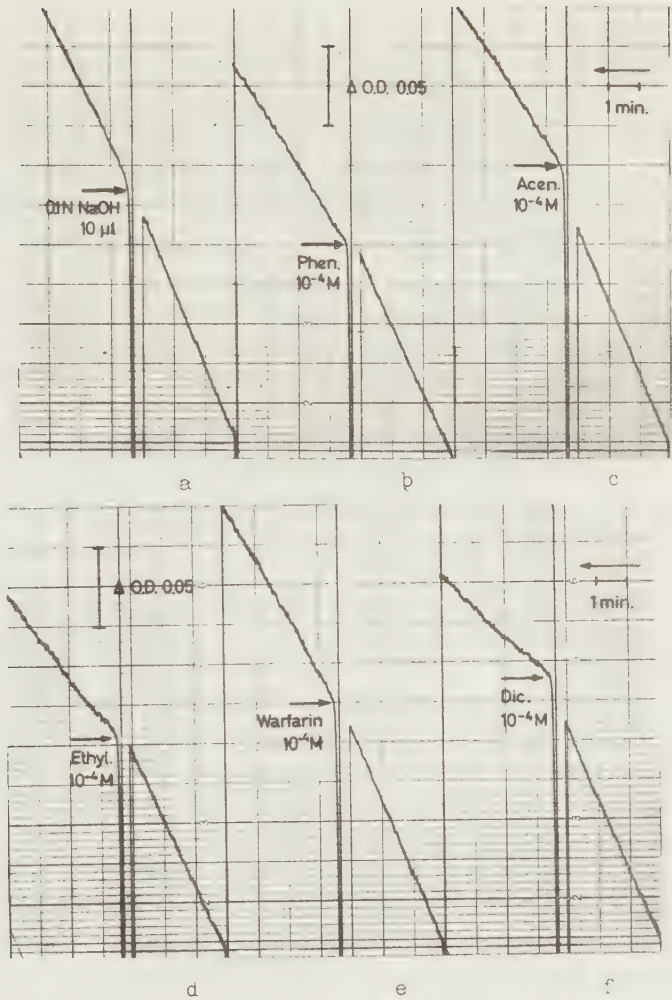


Abb. 4 a-f Hemmung der p-Nitroanisol-O-Demethylierung
durch 4-OH-Cumarinantikoagulantien
Spektralphotometrische Messungen zeitab-
hängiger Extinktionsänderungen am Beckman
DB-GT Spektralphotometer.
Registrierung mit Rikadenki-Schreiber B-104.

Inkubationsbedingungen: Mikrosomen (1 mg Protein/ml) phenobarbitalstimulierter männlicher Ratten, NADPH-regenerierendes System (Glukose-6-Phosphat 3,1 mM, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase 0,56 U/ml, Niacin 13,3 mM), Sörensen-Phosphatpuffer (pH 7,8) und p-Nitroanisol (0,1 mM). Temperatur 30° C, Aquilibrierungszeit 5 Minuten.

Start mit 0,4 mM NADP, nach 3 Minuten Zugabe von:

- a) 10 Mikroliter 0,1 N NaOH
- b) 0,1 mM Phenprocoumarol
- c) 0,1 mM Acenocoumarol
- d) 0,1 mM Ethylbiscoumacetat
- e) 0,1 mM Warfarin
- f) 0,1 mM Dicoumarol

Näheres siehe Methoden.

auf allen sechs Abbildungen deutlich eine konstante zeitabhängige Extinktionszunahme, die der zunehmenden p-Nitrophenolkonzentration entspricht. Der Neigungswinkel bzw. die Steigung der Geraden spiegelt die jeweilige Reaktionsgeschwindigkeit wider. Während in Abb. 4 a nach Zugabe von 10 Mikroliter 0,1 N NaOH (Kontrolle), welche nach 3 Min. erfolgte, praktisch keine Änderung der anfänglichen Reaktionsgeschwindigkeit zu beobachten war, erkennt man in Abb. 3 b-f nach Zugabe verschiedener 4-OH-Cumarinderivate ein mehr oder minder stark ausgeprägtes Abflachen des Kurvenverlaufes. Am deutlichsten ist dieser Hemmeffekt bei Dicoumarol (Abb: 4 f) sichtbar, die geringste inhibitorische Wirkung weist Warfarin (Abb. 4 e) auf.

Wie die quantitative Auswertung ergab, führte die Zugabe der 4-OH-Cumarinderivate in allen Untersuchungen

zu einer Verlangsamung der pNA-O-Demethylierung, das Ausmaß der Hemmung war bei den einzelnen Cumarinanti-koagulantien unterschiedlich. Bei den durchgeführten Kontrollen mit 0,1 N NaOH wurde nur eine geringfügige Veränderung gegenüber der anfänglichen Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet.

Tabelle 4 Zusammenfassung aller spektralphotometrischen Meßergebnisse zur Frage der inhibitorischen Wirkung von 4-OH-Cumarinderivaten auf die p-Nitroanisol-O-Demethylierung. Extinktionsänderungen/Minute nach Zugabe des Cumarinderivates bzw. der NaOH als Kontrolle. Inkubationsbedingungen s. Abb. 4

$\Delta E/\text{Min.} \times 10^{-3}$					
NaOH	Warfarin	Phenproc.	Acenoc.	Ethylbisc.	Dicoumarol
29,2 (1)	27,6 (2)	26,4 (3)	21,0 (4)	19,0 (5)	11,2 (6)
30,2 (1)	29,0 (2)	24,8 (3)	21,1 (5)	21,7 (4)	13,4 (6)
35,6 (1)	29,1 (2)	24,8 (3)	23,8 (4)	21,5 (5)	12,1 (6)
28,4 (1)	24,6 (2)	24,0 (3)	23,4 (4)	21,6 (5)	15,9 (6)
32,0 (1)	26,2 (2)	24,6 (4)	24,8 (3)	20,2 (5)	12,2 (6)
32,8 (1)	27,4 (2)	26,5 (4)	26,6 (3)	23,8 (5)	12,4 (6)
30,0 (1)	22,4 (4)	23,8 (2)	22,8 (3)	16,4 (5)	11,4 (6)
31,4 (1)	24,4 (2)	23,3 (3)	23,0 (4)	22,8 (5)	12,4 (6)
36,8 (1)	32,2 (2)	27,0 (4)	30,4 (3)	22,4 (5)	19,0 (6)
41,3 (1)	36,6 (2)	33,6 (3)	32,0 (4)	27,6 (5)	19,1 (6)
41,6 (1)	37,0 (2)	32,0 (3)	30,7 (4)	26,1 (5)	18,6 (6)
37,6 (1)	32,1 (2)	28,2 (4)	29,2 (3)	24,4 (5)	14,8 (6)
40,6 (1)	35,4 (2)	30,8 (4)	31,4 (3)	29,0 (5)	17,3 (6)
44,2 (1)	37,8 (2)	34,6 (3)	31,9 (4)	27,0 (5)	21,7 (6)
39,6 (1)	34,8 (2)	31,5 (3)	29,7 (4)	25,6 (5)	18,6 (6)
Su. (15)	(32)	(49)	(55)	(74)	(90)

Sämtliche Meßergebnisse einer Versuchsreihe mit 15 Wiederholungen bestehend aus je 6 Einzeluntersuchungen unter Verwendung zweier verschiedener Mikrosomenpräparationen sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Extinktionsänderungen/Min. nach Zugabe eines der 4-OH-Cumarinderivate bzw. der NaOH bei den Kontrollen. Die Zahlen in Klammern geben die Rangfolge innerhalb einer Zeile an und dienen zur statistischen Auswertung nach FRIEDMAN bzw. WILCOXON u. WILCOX (siehe unten).

Die Berechnung der pNA-Umsätze erfolgte mit Hilfe eines Umrechnungsfaktors, der aus einer pNP-Eichkurve (Abb. 3) ermittelt wurde (siehe Methoden). Danach entsprach bei unseren Messungen eine Extinktionseinheit einer entstandenen p-Nitrophenolmenge von 71,4 nMol pro mg Mikrosomen und Minute. Durch Multiplikation der in Tabelle 4 angegebenen Extinktionsänderungen/Min. mit dem Faktor 71,4 ergaben sich daher die entsprechenden Substratumsätze.

In Tabelle 5 sind Mittelwerte und Streuung der Substratumsätze bei der pNA-O-Demethylierung, ausgedrückt in nMol pNP/mg Mikrosomen x Min., sowie prozentuale Hemmung der Reaktion, bezogen auf die Kontrolle, unter dem Einfluß von 4-OH-Cumarinderivaten angegeben.

Die Hemmung der p-Nitroanisol-O-Demethylierung durch 4-OH-Cumarinderivate ist in Abb. 5 graphisch dargestellt. Die Höhe der Säulen entspricht der Reaktionsgeschwindigkeit nach Zugabe von 0,1 N NaOH (Ko.) bzw. Warfarin (1), Phenprocoumarol (2), Acenocoumarol (3), Ethylbiscoumacetat (4) oder Dicoumarol (5). Es handelt sich um arithmetische Mittelwerte und Standard-

Tabelle 5 p-Nitrophenolbildung unter dem Einfluß verschiedener 4-OH-Cumarinderivate bzw. NaOH bei Kontrollen. Arithmetische Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichungen (s), sowie Standardabweichungen vom Mittelwert ($s_{\bar{x}}$). Prozentuale Hemmung (%) bezogen auf die Kontrolle. Inkubationsbedingungen wie unter Abb. 4 beschrieben. (n = 15)

4-OH-Cumarinderivat bzw. Kontrolle	$\bar{x} \pm s$ (nMol pNP/mg Prot.x Min.)	$\pm s_{\bar{x}}$	Hemmung (%)
(Ko) NaOH	2,53 $\pm$ 0,37	0,10	-
(1) Warfarin	2,17 $\pm$ 0,36	0,09	14,2
(2) Phenprocoumarol	1,98 $\pm$ 0,27	0,07	21,7
(3) Acenocoumarol	1,91 $\pm$ 0,29	0,08	24,5
(4) Ethylbiscoumac.	1,66 $\pm$ 0,25	0,06	34,4
(5) Dicoumarol	1,10 $\pm$ 0,25	0,06	56,5

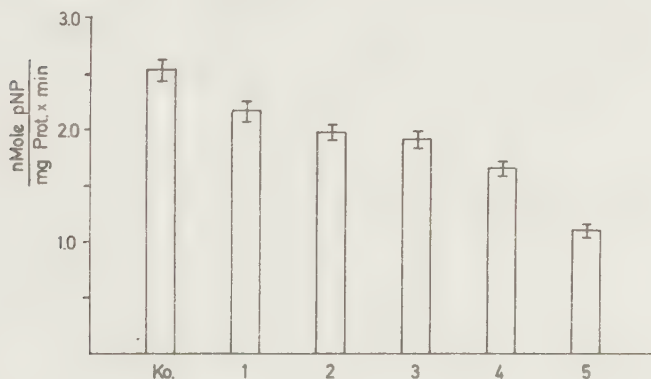


Abb. 5 Inhibitorischer Effekt verschiedener 4-OH-Cumarinderivate auf die p-Nitroanisole-O-Demethylierung. Die Säulengruppen stellen Mittelwerte und Standardabweichungen wie in Tab. 5 dar, die Numerierung entspricht ebenfalls der in Tab. 5 ('n = 15).

abweichungen vom Mittelwert ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) für die in der Minute und pro mg Mikrosomenprotein gebildete p-Nitrophenolmenge in nMol, wie in Tabelle 5 angegeben.

Man erkennt deutlich die unterschiedliche inhibitorische Wirkung der einzelnen Cumarinderivate an der Höhe der Säulen. Es läßt sich daher eine Rangfolge der 4-OH-Cumarinderivate hinsichtlich ihrer inhibitorischen Potenz auf die p-Nitroanisol-O-Demethylierung aufstellen. Dicoumarol zeigte in allen Versuchen den stärksten inhibitorischen Effekt, dann folgte an zweiter Stelle Ethylbiscoumacetat, weiterhin Acenocoumarol und Phenprocoumarol, während Warfarin die schwächste Hemmung hervorrief.

Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde zunächst untersucht, ob überhaupt signifikante Unterschiede der Hemmwirkung bei den untersuchten 4-OH-Cumarinderivaten vorlagen. Wir stellten daher eine Rangfolge der Substanzen innerhalb der insgesamt 15 Wiederholungen auf (Tabelle 4), wobei die Kontrolle als ungehemmte Reaktion stets die Nummer 1 und Dicoumarol als stärkster Inhibitor stets die Nummer 6 erhielt, während die anderen Cumarinderivate in ihrer Rangfolge etwas variierten.

Für den FRIEDMAN-Test als zweifache Varianzanalyse mit Rangzahlen gilt die Prüfgröße:

$$\hat{\chi}_R^2 = \left[\frac{12}{n \cdot k (k + 1)} \sum_{i=1}^k R_i^2 \right] - 3n (k + 1)$$

n = Anzahl der Wiederholungen = 15

k = Anzahl der Bedingungen = 6

$\sum_{i=1}^k R_i^2$ = Summe der Spaltenrangsummen für die k zu vergleichenden Bedingungen.

Die daraus berechnete Prüfgröße betrug in unserem Fall 70,7 und überschritt damit bei weitem die für das 0,1 % Signifikanzniveau geforderte Zahl von 20,5 (für $k = 6$ und $n = 15$). Innerhalb der Gruppe der 4-OH-Cumarinderivate und der Kontrolle liegen also signifikante Unterschiede vor ($p < 0,001$).

Es galt nun zu klären, welche der 4-OH-Cumarinderivate sich untereinander bezüglich ihrer Hemmung der p-NA-O-Demethylierung signifikant unterscheiden. Zu diesem Zweck führten wir multiple Vergleiche abhängiger Stichproben (multiple Varianzanalyse) nach WILCOXON und WILCOX durch. Es wurden hierzu die absoluten Differenzen der Spaltenrangsummen aus Tabelle 4 gebildet und mit der tabellierten kritischen Differenz (KD) für $k = 6$, $n = 15$ verglichen. Übersteigt die absolute Differenz der Spaltenrangsummen zweier Substanzen die kritische Differenz, so besteht ein signifikanter Unterschied auf diesem Signifikanzniveau.

Tabelle 6 Kritische Differenzen für multiple Vergleiche abhängiger Stichproben nach WILCOXON und WILCOX (1964) . Hemmung der p-Nitroanisol-O-Demethylierung durch 4-OH-Cumarinderivate.

+ $p < 0,05$ (KD = 29,2)

++ $p < 0,01$ (KD = 34,5)

($n = 15$, $k = 6$) Näheres siehe Text.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
(1) NaOH	-	17	34 ⁺	40 ⁺⁺	59 ⁺⁺	75 ⁺⁺
(2) Warfarin		-	17	23	42 ⁺⁺	58 ⁺⁺
(3) Phenprocoum.			-	6	25	41 ⁺⁺
(4) Acenocoum.				-	19	35 ⁺⁺
(5) Ethylbisc.					-	16
(6) Dicoumarol						-

Wie aus Tabelle 6 hervorgeht, unterscheiden sich damit signifikant in ihrer inhibitorischen Wirkung auf die p-Nitroanisol-Demethylierung:

1. Dicoumarol für eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 1 % von der Kontrolle, Warfarin, Phenprocoumarol und Acenocoumarol.
2. Ethylbiscoumacetat für eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 1 % von der Kontrolle und Warfarin.
3. Acenocoumarol für eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 1 % von der Kontrolle.
4. Phenprocoumarol für eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % von der Kontrolle.

Alle anderen Unterschiede, wie z. B. zwischen Phenprocoumarol und Acenocoumarol oder zwischen Warfarin und Kontrolle, müssen noch als zufällig gelten.

2. Ergebnisse der spektralanalytischen Untersuchungen zur Wechselwirkung verschiedener 4-Hydroxy-Cumarinderivate mit Cytochrom P-450.

Die Zugabe von 4-Hydroxy-Cumarinderivaten (4-HCD) zu aeroben Mikrosomensuspensionen von Rattenlebern führte zur Ausbildung charakteristischer spektraler Veränderungen. Das Ausmaß dieser spektralen Veränderungen war abhängig von der Konzentration des zugegebenen Substrates und der mikrosomalen Proteinkonzentration. Wie Kontrolluntersuchungen zum zeitlichen Verlauf der oxydativen Bindungsspektren ergaben, war die Entwicklung der spektralen Veränderungen spätestens 2 Min. nach Zugabe des Substrates abgeschlossen, so daß das einmalige Aufzeichnen des Differenzspektrums bei einer Substratkonzentration jeweils genügte. Kontrolluntersuchungen ohne

Mikrosomen zur Frage der Eigenabsorption der untersuchten Coumarinderivate oberhalb einer Wellenlänge von 380 nm zeigten, daß diese nur bei Acenocoumarol berücksichtigt werden mußte.

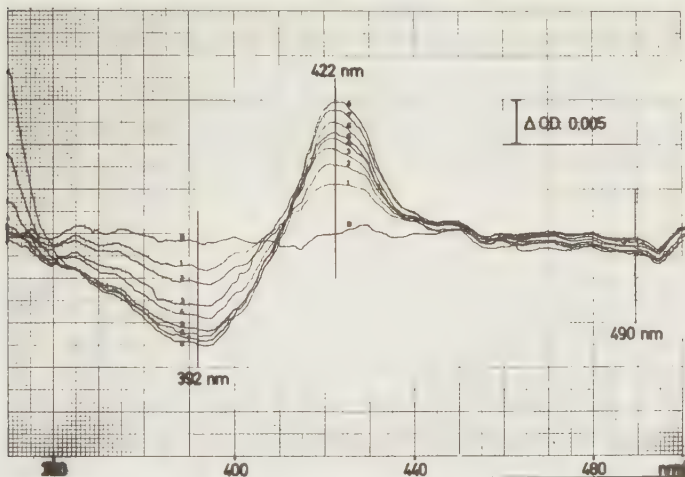


Abb. 6 Differenzspektren für die Bindung von Phenprocoumarol an oxydiertes Cytochrom P-450. Ein Doppelansatz mit 5 mg Mikrosomenprotein/5 ml von phenobarbitalstimulierten männlichen Ratten wurde auf zwei Küvetten verteilt. Nach Errichtung einer Basislinie (B) gleicher Lichtabsorption zwischen Referenz- und Meßküvette erfolgte die sukzessive Zugabe von Phenprocoumarol in die Meßküvette, bzw. entsprechender Volumina 0,1 N NaOH in die Referenzküvette. Die Differenzspektren wurden für folgende Substratkonzentrationen registriert: (1) 1; (2) 2; (3) 5; (4) 10; (5) 20; (6) 50; (7) 100 und (8) 200 μM . Das Verfahren entspricht dem von HILDEBRANDT und Mitarbeitern (1969).

In Abb. 6 sind oxydative Differenzspektren für die Bindung von Phenprocoumarol an Cytochrom P-450 im Original wiedergegeben. Wie zu erkennen ist, führte die sukzessive Zugabe steigender Mengen (von 1 bis 200 μM) Substrat zur Ausbildung von Typ II Bindungsspektren mit einem Wellenberg (Absorptionsmaximum) bei 422 nm und einem Wellental (Absorptionsminimum) bei 391 nm.

Die quantitative Auswertung der oxydativen Bindungsspektren für Phenprocoumarol führt zu einer graphischen Darstellung, wie sie Abb. 7 zeigt. Das Ausmaß der spektralen

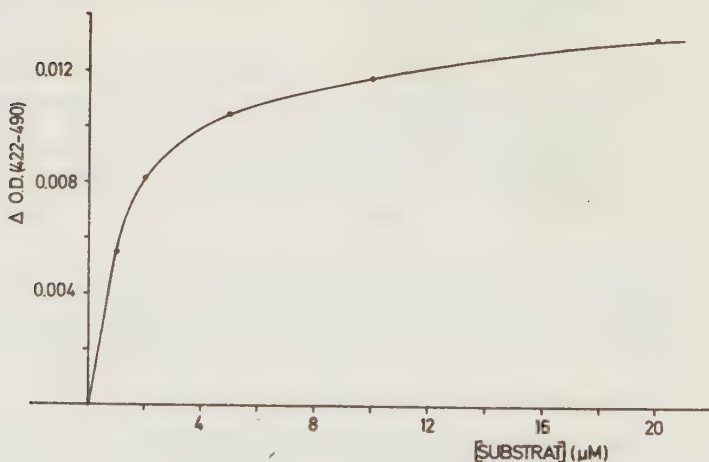


Abb. 7 Ausmaß der spektralen Veränderung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration für die Bindung von Phenprocoumarol an oxydiertes Cytochrom P-450. Quantitative Auswertung der Differenzspektren in Abb. 6. Versuchsbedingungen siehe dort. Erläuterungen siehe Text.

Veränderung, gemessen als Differenz der optischen Dichte zwischen dem Absorptionsmaximum bei 422 nm und einer Bezugswellenlänge bei 490 nm, wird in Abhängigkeit von der Substratkonzentration, in diesem Falle Phenprocoumarol, aufgetragen. Der Verlauf der Kurve entspricht dem einer Sättigungskurve, d. h. mit zunehmender Substratkonzentration geht zunächst eine rasche Zunahme der optischen Dichte einher. Bei höheren Substratkonzentrationen erfolgt die Zunahme der optischen Dichte immer langsamer bis schließlich eine Annäherung an einen Maximalwert erreicht wird.

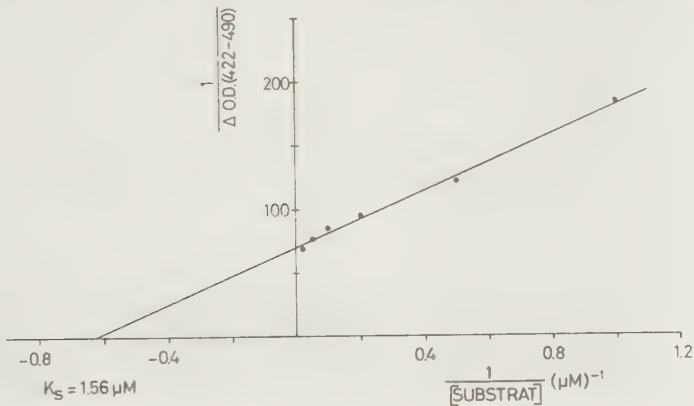


Abb. 8 Doppeltreziproke Darstellung der spektralen Veränderung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration für die Bindung von Phenprocoumarol an oxyliertes Cytochrom P-450 nach Lineweaver-Burk. Versuchsbedingungen wie unter Abb. 6. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die entsprechende doppeltreziproke Darstellung nach Lineweaver und Burke für Phenprocoumarol findet sich in Abb. 8. Die Abscisse entspricht der reziproken Substratkonzentration, in diesem Falle von Phenprocoumarol, die Ordinate gibt die reziproken Werte der optischen Dichte wieder. Die eingezeichnete Regressionsgerade spiegelt die lineare Abhängigkeit im doppeltreziproken Auftragungssystem wider. Ihr Schnittpunkt mit der Ordinate entspricht der reziproken maximalen spektralen Veränderung, als $\Delta O.D._{max}$ bezeichnet.

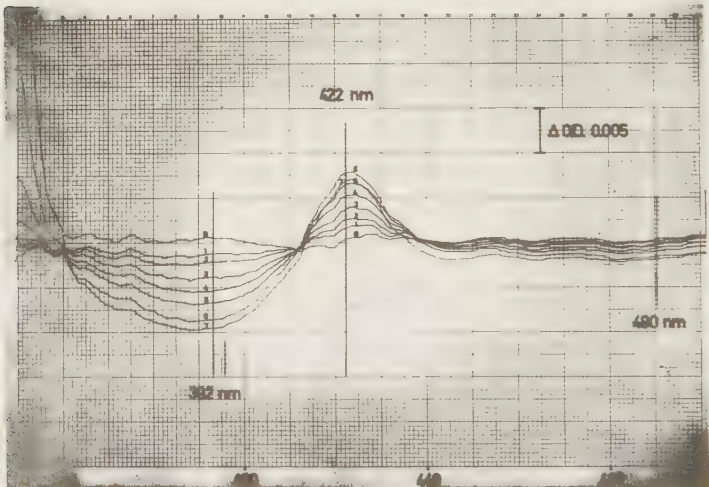


Abb. 9 Differenzspektren für die Bindung von Warfarin an oxydiertes Cytochrom P-450. Der Proteingehalt der Mikrosomensuspension phenobarbital-stimulierter männlicher Ratten betrug 1 mg/ml. Die Differenzspektren wurden unter folgenden Bedingungen registriert: (B) Basislinie; (1) 10; (2) 20; (3) 50; (4) 100; (5) 200; (6) 500 und (7) 1000 μM Warfarin. Versuchsbedingungen wie unter Abb. 6.

Die spektrale Dissoziationskonstante K_s (definiert als diejenige Substratkonzentration, die eine halbmaximale spektrale Veränderung hervorruft) läßt sich aus dem Schnittpunkt der Regressionsgerade mit der Abszisse als dessen reziproker Wert ermitteln. Sie betrug hier $1,56 \mu\text{M}$, im arithmetischen Mittel $1,51 \pm 0,13 \mu\text{M}$.

Abb. 9 zeigt oxydative Bindungsspektren für Warfarin. Es handelt sich ebenfalls um ein Typ II-Spektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 422 nm und einem Absorptionsminimum bei 392 nm. Die zugegebenen Substratmengen

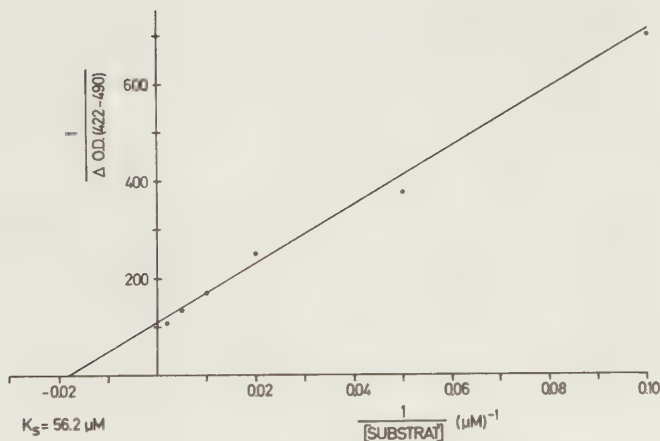


Abb. 10 Doppeltreziproke Darstellung der spektralen Veränderung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration für die Bindung von Warfarin an oxydiertes Cytochrom P-450 nach Lineweaver-Burk. Quantitative Auswertung der Differenzspektren in Abb. 9. Erläuterungen siehe Text.

liegen im Vergleich zu den anderen oxydativen Differenzspektren in einem etwa 10-fach höheren Bereich. Entsprechend liegt auch hier die spektrale Dissoziationskonstante (K_s) mit $56,2 \mu\text{M}$, im arithmetischen Mittel $45,5 \pm 6,2 \mu\text{M}$, etwa um eine Zehnerpotenz höher als bei den anderen Cumarinderivaten. (Abb. 10)

Wie aus Abb. 11 u. 12 zu ersehen ist, muß bei der Beurteilung von Bindungsspektren für Acenocoumarol dessen hohe Eigenabsorption berücksichtigt werden. Diese

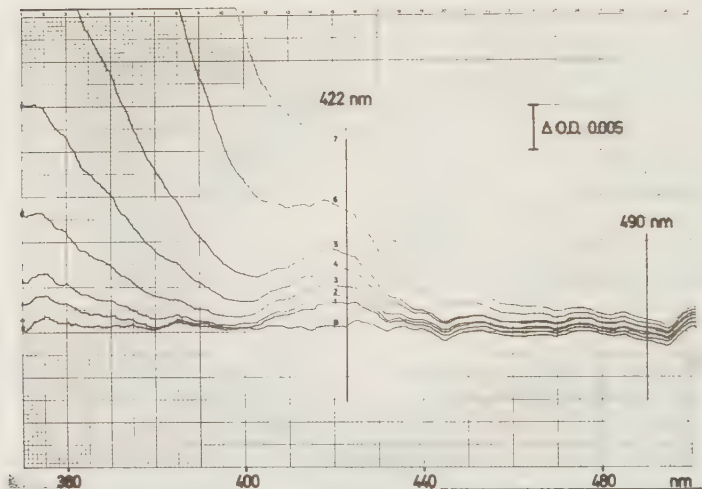


Abb. 11 Differenzspektren für die Bindung von Acenocoumarol an oxydiertes Cytochrom P-450. Der Proteingehalt der Mikrosomensuspension phenobarbitalstimulierter männlicher Ratten betrug 1 mg/ml . Nach Errichtung der Basislinie (B) gleicher Lichtabsorption zwischen beiden Küvetten erfolgte die Zugabe von Acenocoumarol wie unter Abb. 12 beschrieben.

reicht bis in den Bereich von 460 nm hinein, wie die Differenzspektren, welche als Kontrolle gegen Puffer registriert wurden, zeigen. Die oxydativen Bindungs-

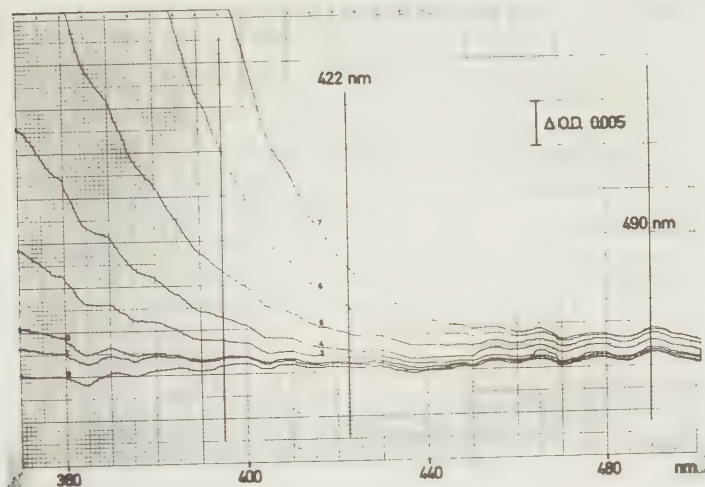


Abb. 12 Eigenabsorption von Acenocoumarol im Wellenlängenbereich von 350 bis 500 nm. In beiden Küvetten befanden sich je 2,5 ml Sörensen-Phosphatpuffer, pH 7,4. Nach Errichtung einer Basislinie (B) gleicher Lichtabsorption zwischen den beiden Küvetten erfolgte die sukzessive Zugabe von Acenocoumarol in die Meßküvette, bzw. entsprechender Volumina 0,1 N NaOH in die Referenzküvette. Die Differenzspektren wurden für folgende Substratkonzentrationen registriert: (1) 1; (2) 2; (3) 5; (4) 10; (5) 20; (6) 50 und (7) 100 μM Acenocoumarol.

spektren für Acenocoumarol, wie es die Abb. 11 wiedergibt, läßt daher zwar ein Absorptionsmaximum bei etwa 422 nm erkennen, ein Absorptionsminimum wird aber durch die in diesem Bereich vorhandene hohe Eigenabsorption des Acenocoumarol überdeckt. Es dürfte sich aber auch hier um ein Typ II-Bindungsspektrum handeln.

Aus Abb. 13 ergibt sich für Acenocoumarol eine spektrale Dissoziationskonstante (K_s) von 3,65 μM , eine aus drei Messungen gemittelte K_s betrug $3,44 \pm 0,33 \mu\text{M}$.

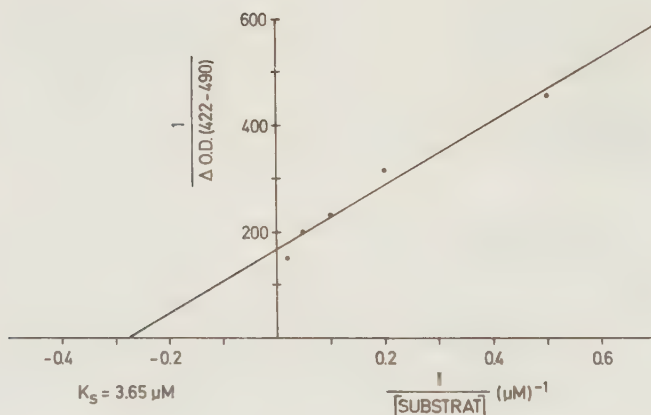


Abb. 13 Doppeltreziproke Darstellung der spektralen Veränderung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration für die Bindung von Acenocoumarol an oxydiertes Cytochrom P-450 nach Lineweaver-Burk. Quantitative Auswertung der Differenzspektren in Abb. 11 unter Berücksichtigung der in Abb. 12 dargestellten Eigenabsorption. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Während die bisher beschriebenen oxydativen Bindungsspektren von Phenprocoumarol, Warfarin und Acenocoumarol eine eindeutige Zuordnung zu den Typ II Bindungsspektren, wie sie von SCHENKMAN et al. (1967) erstmalig beschrieben wurden, zuließen, war dies bei den beiden weiteren 4-Hydroxy-Cumarinderivaten, besonders aber beim Dicoumarol problematisch.

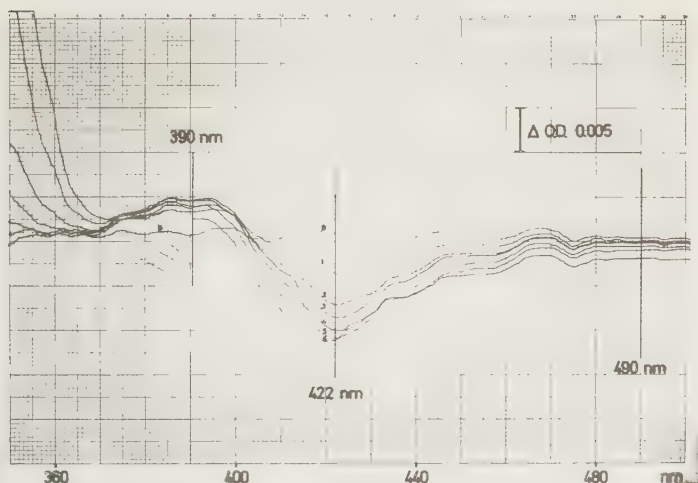


Abb. 14 Differenzspektren für die Bindung von Ethylbiscouacetat an oxydiertes Cytochrom P-450. Der Proteingehalt der Mikrosomensuspension phenobarbitalstimulierter männlicher Ratten betrug 1 mg/ml. Die Differenzspektren wurden unter folgenden Bedingungen registriert: (B) Basislinie; (1) 2; (2) 5; (3) 10; (4) 20; (5) 50 und (6) 100 μ M Ethylbiscouacetat. Versuchsbedingungen wie unter Abb. 6.

Die oxydativen Differenzspektren für Ethylbiscoumacetat in Abb. 14 zeigen im Vergleich zu den Spektren der Abb. 6, 9 u. 12 nahezu spiegelbildliches Verhalten. Das Absorptionsmaximum liegt hier bei etwa 390 nm, das Absorptionsminimum bei 422 nm. Es handelt sich also im Gegensatz zu den oxydativen Bindungsspektren von Phenprocoumarol, Warfarin und Acenocoumarol hier um ein Typ I-Bindungsspektrum, wie es von KRATZ und STAUDINGER (1968) bereits für den Cumaringrundkörper gezeigt wurde.

Die aus der doppeltreziproken Darstellung in Abb. 15 ermittelte spektrale Dissoziationskonstante (K_s) betrug hier für Ethylbiscoumacetat 3,28 μM , im arithmetischen Mittel aus drei Messungen ($n = 3$) $2,73 \pm 0,28 \mu\text{M}$.

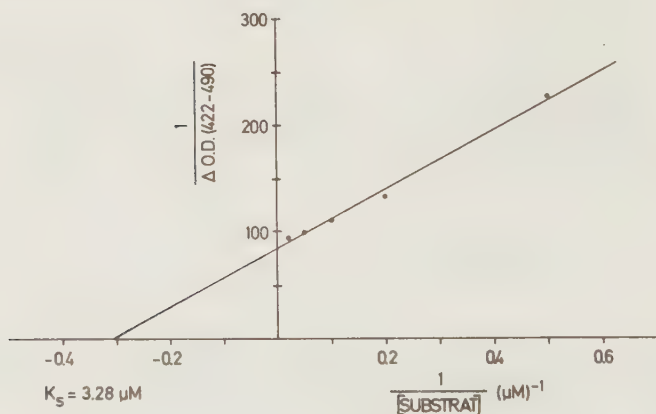


Abb. 15 Doppeltreziproke Darstellung der spektralen Veränderung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration für die Bindung von Ethylbiscoumacetat an oxydiertes Cytochrom P-450 nach Lineweaver-Burk. Quantitative Auswertung der Differenzspektren in Abb. 14. Erläuterungen siehe Text.

Problematisch war die Beurteilung der spektralen Veränderung nach Zugabe von Dicoumarol zu oxydiertem Cytochrom P-450. Wie aus Abb. 16 ersichtlich ist, ist bei etwa 415 nm ein angedeutetes Absorptionsmaximum im Bereich niedriger Substratkonzentrationen vorhanden, welches aber mit zunehmender Substratkonzentration undeutlicher wird und schließlich beinahe aufgehoben wird. Klarer erkennbar ist ein Absorptionsminimum bei ~429 nm, welches auch zur quantitativen Auswertung herangezogen wurde. Das insgesamt im Vergleich zu einem Typ I-Bindungsspektrum nach rechts, d. h. also in den Bereich höherer Wellenlängen verlagerte Dicoumarolbindungsspektrum

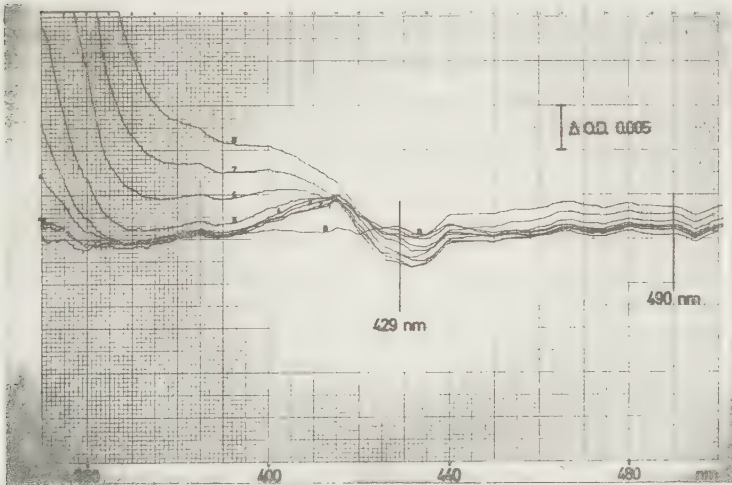


Abb. 16 Differenzspektren für die Bindung von Dicoumarol an oxydiertes Cytochrom P-450. Der Proteingehalt der Mikrosomensuspension phenobarbital-stimulierter männlicher Ratten betrug 1 mg/ml. Die Differenzspektren wurden unter folgenden Bedingungen registriert: (B) Basislinie; nach Zugabe von (1) 1; (2) 2; (3) 5; (4) 10; (5) 20; (6) 50; (7) 100 und (8) 200 μ M Dicoumarol. Versuchsbedingungen wie unter Abb. 6.

könnte man daher als modifiziertes Typ I-Spektrum betrachten (SCHENKMAN et al., 1967).

Die aus der doppeltreziproken Darstellung in Abb. 17 ermittelte spektrale Dissoziationskonstante (K_s) betrug hier für Dicoumarol $4,30 \mu\text{M}$, im arithmetischen Mittel aus drei Messungen ($n = 3$) $4,88 \pm 0,85 \mu\text{M}$.

In Tabelle 7 wurden Charakteristika der oxydativen Bindungsspektren für Phenprocoumarol, Warfarin, Acenocoumarol, Ethylbiscoumacetat und Dicoumarol einander gegenübergestellt. Auffallend war, daß die dem "Monocumarin" -Typ zugehörigen 4-Hydroxy-Cumarinderivate übereinstimmend eine spektrale Veränderung vom Typ II hervorriefen, während die "Dicumarine" Ethyl-

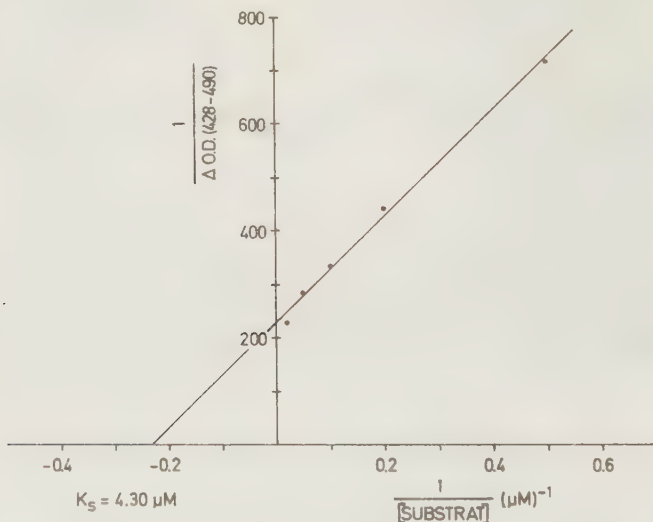


Abb. 17 Doppeltreziproke Darstellung der spektralen Veränderung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration für die Bindung von Dicoumarol an oxydiertes Cytochrom P-450 nach Lineweaver-Burk. Quantitative Auswertung der Differenzspektren in Abb. 16. Erläuterungen siehe Text.

Tabelle 7 Typen spektraler Veränderungen bei der Bindung von 4-Hydroxy-Cumarinderivaten an oxydiertes Cytochrom P-450.

Substrat	Cumarin-Typ	$\lambda_{\text{max.}}$ (nm)	$\lambda_{\text{min.}}$ (nm)	Bindungs-Typ
Warfarin	mono-	422	~ 390	Typ II
Acenocoumarol	mono-	~ 422	~ 392	Typ II
Phenprocoumarol	mono-	422	~ 392	Typ II
Ethylbiscoumac.	di-	~ 390	~ 422	Typ I
Dicoumarol	di-	~ 410	~ 429	mod. Typ I

biscoumacetat und Dicoumarol zur Ausbildung von Typ I- bzw. modifiziertem Typ I-Bindungsspektrum führten.

Eine Zusammenfassung aller Meßergebnisse aus Versuchsserien zur Bestimmung der spektralen Dissoziationskonstanten (K_s) für 4-Hydroxy-Cumarinderivate gibt die Tabelle 8. Die Zahlenangaben beziehen sich auf Absorptionsunterschiede bei 422 nm verglichen mit 490 nm, mit Ausnahme des Dicoumarol, wo die optische Dichte bei 429 nm mit der bei 490 nm verglichen wird, in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Für jede untersuchte Substanz wurden drei Wiederholungen mit verschiedenen Mikrosomenpräparationen durchgeführt.

In Tabelle 9 sind die Daten der Regressionsgeraden für die doppeltreziproken Darstellungen der spektralen Veränderungen, welche zur Bestimmung der spektralen Dissoziationskonstanten (K_s) dienten, zusammengefaßt. Angegeben sind die Schnittpunkte der Regressionsgeraden mit der Abszisse bzw. der Ordinate, die Steigungen der Regressionsgeraden, die scheinbaren spektralen Dissoziationskonstanten (K_s), die maximalen spektralen Veränderungen, sowie die Korrelationskoeffizienten (r). Für jede Substanz ergaben sich auch hier je drei Regressi-

onsgeraden entsprechend dreier verschiedener Mikro-
somenpräparationen A, B u. C.

Tabelle 8 Ausmaß der spektralen Veränderung bei der
Bindung von 4-Hydroxy-Cumarinderivaten an
oxydiertes Cytochrom P-450 in Abhängigkeit
von der Substratkonzentration für drei ver-
schiedene Mikrosomenpräparationen A,B,C.

[S]	μM						
		1,0	2,0	5,0	10,0	20,0	50,0
$\Delta \text{O.D. (422-490)} \times 10^{-3}$ *	Phenpr.	3,40	4,58	6,24	7,28	8,64	9,96
		6,60	8,60	11,30	12,80	14,20	14,94
		5,44	8,14	10,44	11,62	13,16	14,10
	Ethylb.		2,26	3,64	4,00	4,48	
			3,00	4,38	5,32	5,96	
			4,40	7,54	9,10	10,02	
	Acenoc.		2,32	3,15	4,06	4,24	6,76
			2,12	3,01	4,48	5,20	6,20
			2,20	3,15	4,30	5,00	6,70
	Dicoum.		1,40	2,26	3,00	3,50	4,40
			1,54	2,40	3,90	5,00	6,40
			2,86	4,20	4,90	6,80	9,70
[S]	μM	10,0	20,0	50,0	100,0	200,0	500,0
Warf.		1,14	1,69	3,36	4,24	5,10	5,88
		1,42	2,64	4,00	5,88	7,54	9,50
		2,50	4,22	6,14	7,98	9,72	11,44

* Bei Dicoumarol wurde die Differenz der optischen
Dichte zwischen 428 nm und 490 nm ausgewertet.
($\Delta \text{O.D. 428-490}$) $\times 10^{-3}$

Tabelle 9

Daten der Regressionsgeraden für die doppelreziproken Darstellungen der spektralen Veränderung in Abhängigkeit vom der Substratkonzentration. (K_s -Bestimmung) Angegeben sind die Schnittpunkte der Regressionsgeraden mit der Abszisse bzw. der Ordinate, die Steigung der Regressionsgeraden, die scheinbare spektrale Dissoziationskonstante (K_s), die maximale spektrale Veränderung und der Korrelationskoeffizient (r).

Substrat	Abszisse Substrat μM ⁻¹	Ordinate $\Delta \text{O.D. (490-422)}^* \Delta \text{O.D.}$ ⁻¹	Steigung (μM) ⁻¹	K_s (μM)	$\Delta \text{O.D. max.}$ $\times (10^{-3})$	Korrelations- koeffizient(r)
Phenprocoum.	- 0,586	111,5	190	1,71	8,97	0,989
	- 0,789	68,2	86	1,26	14,66	0,995
	- 0,639	71,2	111	1,56	14,04	0,998
Ethylbiscoum.	- 0,399	194,1	486	2,50	5,15	0,994
	- 0,416	151,8	365	2,40	6,59	0,999
	- 0,305	84,8	278	3,28	11,79	0,996
Acenocoumarol	- 0,358	185,5	518	2,79	5,39	0,955
	- 0,258	165,3	641	3,88	6,05	0,984
	- 0,274	165,6	604	3,65	6,04	0,983
Dicoumarol	- 0,232	229,1	986	4,30	4,37	0,997
	- 0,153	156,5	1024	6,55	6,39	0,987
	- 0,263	124,5	473	3,80	8,03	0,971
Warfarin	- 0,022	157,3	7170	45,60	6,36	0,999
	- 0,018	105,5	5924	56,20	9,48	0,997
	- 0,029	89,3	3097	34,70	11,20	0,998

* Bei Dicoumarol wurde die Differenz der optischen Dichte ($\Delta \text{O.D.}$) zwischen 429 nm und 490 nm zur Auswertung herangezogen.

In Tabelle 10 sind die spektralen Dissoziationskonstanten (K_s) für die Bindung von 4-Hydroxy-Cumarinderivaten an phenobarbitalstimulierte Rattenlebermikrosomen unter oxydativen Bedingungen zusammengefaßt. Es sind arithmetische Mittelwerte ($\bar{x}$) und Streuung vom Mittelwert ($s_{\bar{x}}$) für eine Versuchsreihe an drei verschiedenen Mikrosomenpräparationen angegeben.

Tabelle 10 Spektrale Dissoziationskonstanten (K_s) für die Bindung von 4-Hydroxy-Cumarinderivaten an oxydiertes Cytochrom P-450. Angegeben sind Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichung vom Mittelwert ($s_{\bar{x}}$) für $n = 3$.

4-OH-Cumarinderivat	K_s (μM)
Phenprocoumarol	$1,51 \pm 0,13$
Ethylbiscoumacetat	$2,81 \pm 0,36$
Acenocoumarol	$3,44 \pm 0,33$
Dicoumarol	$4,89 \pm 0,84$
Warfarin	$45,5 \pm 6,20$

D) DISKUSSION

Es konnte ein inhibitorischer Effekt sämtlicher untersuchter 4-Hydroxy-Cumarinantikoagulantien auf die mischfunktionelle Oxydase von Rattenlebermikrosomen, dargestellt an der in vitro-Modellreaktion der p-Nitroanisol-O-Demethylierung, gezeigt werden, wobei eine z. T. signifikant unterschiedliche inhibitorische Potenz der einzelnen 4-Hydroxy-Cumarinderivate (4-HCD) deutlich wurde.

Während Dicoumarol stets die stärkste inhibitorische Wirkung auf die pNA-O-Demethylierung ausübte, war Warfarin bei allen gemessenen pNA-Umsätzen der schwächste Inhibitor. Phenprocoumarol, Acenocoumarol und Ethylbiscoumacetat lagen, bezogen auf ihre inhibitorische Potenz, zwischen den beiden Extremen Dicoumarol und Warfarin. Signifikante Unterschiede hinsichtlich ihrer Hemmwirkung auf die pNA-O-Demethylierung konnten innerhalb dieser Gruppe für diese drei 4-HCD nicht nachgewiesen werden.

Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen die Autoren DECKERT und REMMER (1972), die am Beispiel der Anilinhydroxylierung bzw. der Amidopyrindemethylierung unterschiedliche Hemmeffekte für 4-HCD nachweisen konnten. Auch bei diesen Untersuchungen war Dicoumarol inhibitorisch am stärksten, Warfarin am schwächsten wirksam, während die Werte für die halbmaximale Hemmkonzentration (I_{50}) von Phenprocoumarol und Acenocoumarol dazwischen lagen. Ethylbiscoumacetat wurde von diesen Autoren nicht untersucht. Bemerkenswert ist, daß die halbmaximale Hemmstoffkonzentration für Dicoumarol mit $1 \mu\text{M}$ für die Anilinhydroxylierung und $0,2 \mu\text{M}$ für die Amidopyrindemethylierung in der gleichen Größenordnung liegen wie die von uns für eine 56%ige Hemmung der pNA-Demethylierung erforderliche Konzentration von Dicoumarol mit $0,1 \mu\text{M}$.

CHRISTENSEN und WISSING (1972) kamen z. T. zu unterschiedlichen Ergebnissen. Sie konnten zwar sowohl bei der Anilinhydroxylierung als auch bei der Amidopyrin- bzw. pNA-Demethylierung eine Hemmung durch 4-HCD nachweisen; die

Reihenfolge innerhalb der Gruppe der untersuchten 4-HCD hinsichtlich ihrer inhibitorischen Potenz war jedoch stark divergierend. Warfarin war zwar auch bei allen drei untersuchten Modellreaktionen der schwächste, Dicoumarol jedoch nur bei der Amidopyridemethylierung der stärkste Inhibitor, während es bei der Anilinhydroxylierung durch Acenocoumarol und bei der pNA-Demethylierung durch Phenprocoumarol, wenn auch nur geringfügig, in seiner inhibitorischen Wirkung übertroffen wurde (CHRISTENSEN und WISSING, 1972).

Beim Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen von CHRISTENSEN und WISSING (1972) fällt auf, daß Phenprocoumarol sich bei unseren Untersuchungen als deutlich schwächerer Inhibitor der pNA-Demethylierung als das Dicoumarol erwies und in der Rangfolge innerhalb der Gruppe der 4-HCD vor dem Warfarin den vorletzten Platz einnahm, während CHRISTENSEN und WISSING (1972) Phenprocoumarol die stärkste inhibitorische Wirkung auf die pNA-Demethylierung innerhalb der Gruppe der 4-HCD zuschrieben. Möglicherweise sind methodische Unterschiede hierfür verantwortlich zu machen. Während wir ausschließlich PB-stimulierte Rattenlebermikrosomen verwendeten, wurden bei den Untersuchungen dieser Autoren nicht-vorbehandelte Rattenlebermikrosomen benutzt. Vielleicht sind auch die z. T. quantitativ unterschiedlichen Ergebnisse hierdurch mitverursacht; während CHRISTENSEN und WISSING (1972) bei einer Hemmstoffkonzentration von $330 \mu\text{M}$ für Dicoumarol eine 32%ige Hemmung der pNA-Demethylierung fanden, hatte in unseren Untersuchungen bereits eine Dicoumarolkonzentration von $100 \mu\text{M}$ eine 56%ige Hemmung dieser Modellreaktion zur Folge. Sicherlich spielen hierbei auch unterschiedliche Substratkonzentrationen eine wesentliche Rolle: sie betrug bei unseren Messungen, wie die Hemmstoffkonzentration, $100 \mu\text{M}$, bei den oben genannten Autoren wurden jedoch deutlich höhere pNA-Konzentrationen vorgegeben.

Eine Verfälschung der Meßergebnisse durch Verdünnungseffekte konnten wir dadurch ausschließen, daß wir bei Kontrollen die gleichen Volumina des Lösungsmittels (0,1 N NaOH) zugaben. Alterungsprozesse der Mikrosomensuspensionen wurden durch Variationen des Zugabemodus nach einem zufälligen Schema weitgehend ausgeschaltet. Vorversuche hatten gezeigt, daß lineare Reaktionsabläufe innerhalb der ersten 8 - 10 min zu erwarten waren, wenn dem NADPH-regenerierenden System Niacin zugesetzt war, dabei mußte allerdings eine leichte Verlangsamung des Reaktionsablaufes bei der pNA-Demethylierung in Kauf genommen werden.

Bei ergänzenden Untersuchungen mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen fanden wir in Übereinstimmung mit WISSING und CHRISTENSEN (1973) nach Inhibitorzugabe im doppeltreziproken Lineweaver-Burk-Diagramm einen linearen Kurvenverlauf bei niedrigen p-Nitroanisolkonzentrationen, dagegen einen nicht-linearen Kurvenverlauf bei hohen Substratkonzentrationen. Diese Beobachtungen machten wir bei allen untersuchten 4-Hydroxy-Cumarinantikoagulantien.

Diese Befunde lassen vermuten, daß bei der Hemmung der p-Nitroanisol-Demethylierung durch 4-Hydroxy-Cumarinantikoagulantien ein gemischter Hemmeffekt vorliegt. Bei niedrigen Substratkonzentrationen kommt es offenbar zu einer Verdrängung des Substrates durch den Inhibitor aus der Enzymsubstratbindung, bei hohen Substratkonzentrationen dagegen muß ein Eingriff am Elektronentransportsystem durch Hemmung der NADPH-Cytochrom-P-450-reduktase und der NADH-Ferricyanidreduktase, wie in den Arbeiten von WISSING und CHRISTENSEN (1973) nachgewiesen werden konnte, angenommen werden. Daneben ist ein Teil der inhibitorischen Wirkung der lipophilen 4-Hydroxy-Cumarinantikoagulantien auf die

Umwandlung des Cytochrom P-450, der aktiven mischfunktionellen Oxydase, in die inaktive Form des Cytochrom P-420 zurückzuführen, wie von WISSING und CHRISTENSEN (1973) für das Dicoumarol nachgewiesen werden konnte. Andere Autoren konnten zeigen, daß dieser Teilaspekt des Hemmeffektes auch auf andere hydrophobe Substanzen, wie z. B. verschiedene Phenole, zutrifft. Auch bei diesen konnte eine Umwandlung von Cytochrom P-450 in Cytochrom P-420 festgestellt werden (ICHIKAWA et al., 1968).

Ob die in vitro gemachten Beobachtungen bezüglich der Hemmung mischfunktioneller Oxydasereaktionen an Rattenlebermikrosomen durch 4-Hydroxy-Cumarinantikoagulantien auch auf die Verhältnisse in vivo, und hier besonders beim Menschen, zu erwarten sind, muß offen bleiben. Immerhin haben vergleichende Untersuchungen von DECKERT und REMMER (1972) an Ratten- und Menschenlebermikrosomen gezeigt, daß die Ergebnisse nicht zwangsläufig auf den Menschen übertragbar sind. Klinische Beobachtungen haben aber inzwischen ergeben, daß besonders bei Arzneimitteln mit hoher Eiweißbindung klinisch relevante Hemmwirkungen durch 4-Hydroxy-Cumarinantikoagulantien hervorgerufen werden können. Besonders typische Beispiele hierfür sind Zwischenfälle bei gleichzeitiger Verabreichung von Diphenylhydantoin (HANSEN et al., 1966) bzw. Tolbutamid (KRISTENSEN et al., 1967; SOLOMON, SCHROGIE, 1967) und Antikoagulantien vom Cumarintyp. Es ist zu vermuten, daß diese Zwischenfälle auf eine Hemmung des Metabolismus durch 4-Hydroxy-Cumarinantikoagulantien zurückzuführen sind.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden oxydative Differenzspektren für die Bindung von Phenprocoumarol, Warfarin, Acenocoumarol, Ethylbiscoumacetat und Dicoumarol dargestellt. Nach unserer Kenntnis wurden Bindungsspektren

in der Literatur bisher nur für Cumarin (KRATZ und STAUDINGER, 1968), Phenprocoumarol (CHRISTENSEN und WISSING, 1972), Warfarin (DIAUGUSTINE, 1970; FOUTS et al., 1970; DECKERT und REMMER, 1972; FASCO et al., 1977; CHRISTENSEN und WISSING, 1972) und Dicoumarol (CHRISTENSEN und WISSING, 1972) beschrieben, während für Acenocoumarol und für Ethylbiscoumacetat oxydative Differenzspektren nicht angegeben wurden.

Charakteristische spektrale Veränderungen von Lebermikrosomen durch Zugabe von Cumarinen wurden erstmals von KRATZ und STAUDINGER (1968) beobachtet. Sie beschrieben für den CumarinGrundkörper ein Typ I-Spektrum (SCHENKMAN et al., 1967) mit einem Absorptionsmaximum bei 390 nm und einem Absorptionsminimum bei 425 nm und verwendeten PB-stimulierte und nicht-vorbehandelte Kaninchenlebermikrosomen. Für das Ausmaß der spektralen Änderung stellten diese Autoren eine Abhängigkeit sowohl von der Substrat- als auch von der Proteinkonzentration fest.

Auch wir konnten konzentrationsabhängige spektrale Veränderungen bei Zugabe von allen untersuchten 4-Hydroxy-Cumarinantikoagulantien zu PB-stimulierten Rattenlebermikrosomen beobachten. Während die dem Monocumarintyp zuzuordnenden 4-Hydroxy-Cumarine Phenprocoumarol, Acenocoumarol und Warfarin leicht modifizierte Typ II-Spektren mit Absorptionsmaxima bei 422 nm und Absorptionsminima bei 392 nm ergaben, zeigten die beiden Dicumarine Dicoumarol und Ethylbiscoumacetat spektrale Veränderungen, die wir dem Typ I nach SCHENKMAN et al. (1967) zuordnen konnten.

Beim Dicoumarolspektrum fanden wir eine Verschiebung zum langwelligen Bereich hin, mit einem Absorptionsmaximum bei 410 nm und einem Absorptionsminimum bei 429 nm, so

daß man analog zu den modifizierten Typ II-Spektren (SCHENKMAN et al., 1967) hier von einem modifizierten Typ I-Spektrum sprechen könnte. CHRISTENSEN und WISSING (1972), die bei ihren Untersuchungen nicht-vorbehandelte Rattenlebermikrosomen benutzten, beschrieben zwar in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen ebenfalls modifizierte Typ II-Spektren für Phenprocoumarol und Warfarin mit vergleichbaren Absorptionsmaxima bzw. -minima, fanden aber im Gegensatz zu unseren Befunden für Dicoumarol ein modifiziertes Typ II-Spektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 420 nm und einem Absorptionsminimum bei etwa 390 nm. Dieser Widerspruch erscheint uns insofern schwer erklärbar, als für Dicoumarol stereoisomere Formen wie beim Warfarin oder Phenprocoumarol nicht existieren.

Auch bezüglich des Ethylbiscoumacetat kommen CHRISTENSEN und WISSING (1972) zu anderen Ergebnissen: während bei unseren spektralanalytischen Untersuchungen auch bei Ethylbiscoumacetat konzentrationsabhängige spektrale Veränderungen beobachtet werden konnten, die mit einem Absorptionsmaximum bei etwa 390 nm und einem Absorptionsminimum bei etwa 422 nm einem Typ I-Spektrum entsprechen, rief nach Auffassung dieser Autoren Ethylbiscoumacetat ebenso wie 4-Hydroxy-Cumarin keinerlei spektrale Veränderungen hervor.

Für Acenocoumarol, dessen Messung wegen seiner hohen Eigenabsorption im Wellenlängenbereich zwischen 350 und 460 nm methodische Schwierigkeiten bereitete, konnten wir durch Subtraktion der konzentrationsabhängigen Eigenabsorption (Abb. 12) von dem für die jeweilige Konzentration registrierten oxydativen Differenzspektrum (Abb. 11), wie oben erwähnt, ein modifiziertes Typ II-Spektrum mit einem Absorptions-

minimum bei etwa 392 nm errechnen. Vergleichbare Darstellungen fehlen, soweit uns bekannt ist, bisher in der Literatur.

Eingehend untersucht wurden hingegen von zahlreichen Autoren oxydative Differenzspektren von Warfarin. Differenzierte spektrophotometrische Untersuchungen der stereoisomeren Verbindungen (R- und S-Enantiomere) des 4-Hydroxy-Cumarinantikoagulans Warfarin wurden nur in der Arbeit von FASCO et al. (1977) vorgenommen. Diese Autoren beschrieben sowohl für das R- als auch für das S-Enantiomer des Warfarin modifizierte Typ II-Spektren bei nicht-vorbehandelten und bei PB-stimulierten Rattenlebermikrosomen, wiesen aber für die S-Form des Warfarin bei Verwendung phenobarbitalstimulierter Mikrosomen eine zusätzliche Typ I-Spektrum-Komponente nach (FASCO et al., 1977). Für das Racemat des Warfarin fanden wir in Übereinstimmung mit DECKERT und REMMER (1972); CHRISTENSEN und WISSING (1972) sowie FASCO et al., (1977) ein modifiziertes Typ II-Spektrum mit einem Absorptionsmaximum bei etwa 422 nm und einem Absorptionsminimum bei etwa 390 nm.

Spektrale Dissoziationskonstanten (K_s) sind unseres Wissens bisher nur für Cumarin an Kaninchenlebermikrosomen (KRATZ und STAUDINGER, 1968) sowie für Warfarin (DECKERT und REMMER, 1972; FASCO et al., 1977) und Dicoumarol (CHRISTENSEN und WISSING, 1972) an Rattenlebermikrosomen bestimmt worden; für Phenprocoumarol, Acenocoumarol und Ethylbiscoumacetat fehlen entsprechende Untersuchungen.

Vergleicht man die in der Literatur angegebenen Werte für spektrale Dissoziationskonstanten von 4-Hydroxy-Cumarinantikoagulantien, so stellt man ein Mehrfaches ausmachende oder sogar eine Größenordnung überschreitende Unterschiede fest. Beispielsweise fanden DECKERT und REMMER (1972) bei Verwendung von nicht-vorbehandelten Rattenlebermikrosomen für Warfarin eine K_s von 250 μM .

Dieser Wert liegt etwa fünfmal so hoch, wie der von uns für Warfarin ermittelte Wert von $45 \mu\text{M}$. CHRISTENSEN und WISSING (1972) gaben für Dicoumarol mit $65 \mu\text{M}$ einen im Vergleich zu unseren Ergebnissen sogar fast 13-fachen Wert an.

Wie sind diese doch erheblichen Differenzen zu erklären?

Einmal ist zu berücksichtigen, daß unterschiedliche Vorbehandlung der Tiere offenbar einen Einfluß auf die Bestimmung der spektralen Dissoziationskonstante hat, wie die Untersuchungen von FASCO et al. (1977) eindeutig zeigten. So liegen z. B. die K_s -Werte nicht-vorbehandelter Rattenlebermikrosomen für R-Warfarin um das 2- bis 14-fache, für S-Warfarin um das 5- bis 18-fache über denen PB-stimulierter Rattenlebermikrosomen. Sowohl DECKERT und REMMER (1972) als auch CHRISTENSEN und WISSING (1972) verzichteten aber bei ihren Untersuchungen auf eine Vorbehandlung der Versuchstiere.

Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt ergibt sich aus der methodischen Schwierigkeit bei der Bestimmung der K_s ; bei PB-stimulierten Rattenlebermikrosomen besteht offensichtlich eine biphasische Abhängigkeit der spektralen Veränderungen von der Substratkonzentration, die an einem, besonders bei hohen Substratkonzentrationen zu beobachtenden, nicht-linearen Verlauf in der doppelt-reziproken Darstellung für die Bindung von 4-Hydroxy-Cumarinantikoagulantien an oxydiertes Cytochrom P-450 nach Lineweaver-Burk zu erkennen ist. Diese biphasischen Kurvenverläufe wurden auch von FASCO et al. (1977) für beide Warfarinenantiomere gefunden und veranlassten diese Autoren, bei PB-stimulierten Rattenlebermikrosomen jeweils zwei K_s -Werte für einen höheren bzw. niedrigeren Substratkonzentrations-Bereich anzugeben.

Um eine gewisse Willkür bei der Auswahl der für die Berechnung der Regressionsgeraden verwendeten Datenpaare zu vermeiden, haben wir uns, zu Gunsten einer besseren Vergleichbarkeit der K_s - Werte innerhalb der Gruppe der 4-Hydroxy-Cumarinantikoagulantien, entschieden, jeweils nur einen K_s - Wert aus der Regressionsgerade aller Meßpunkte zu bestimmen. Wie aus Tabelle 9 zu ersehen ist, ergeben sich trotz dieser methodischen Schwierigkeiten auch für Acenocoumarol bei einer linearen Regression noch recht günstige Korrelationskoeffizienten.

Nach dem Gesagten überrascht es nicht, daß die von FASCO et al. (1977) für Warfarin angegebenen K_s - Werte bei Verwendung phenobarbitalstimulierter Rattenlebermikrosomen mit $70 + 30 \mu\text{M}$ für die R - Form, bzw. $120 \pm 20 \mu\text{M}$, für die S-Form zumindest bei geringeren Substratkonzentrationen, mit dem von uns für das Warfarin-Racemat ermittelten Wert von $45 \pm 6 \mu\text{M}$ gut übereinstimmen.

Die eingangs der Arbeit aufgeworfene Frage, ob eine Korrelation zwischen inhibitorischer Wirkung durch 4-Hydroxy-Cumarinantikoagulantien einerseits, untersucht am Beispiel der p-Nitroanisol-O-Demethylierung, und Affinität zum Cytochrom P-450, ausgedrückt durch die spektralen Dissoziationskonstanten, andererseits besteht, kann nach den vorliegenden Ergebnissen nur eingeschränkt bejaht werden.

Warfarin als schwächster Inhibitor der pNA-Demethylierung zeigte auf Grund der spektralanalytischen Untersuchungsergebnisse mit einer fast 10 - fach höheren K_s gegenüber dem stärksten Inhibitor Dicoumarol auch die deutlich geringere Affinität zum Cytochrom P-450. Bei den übrigen untersuchten 4-Hydroxy-Cumarinantikoagulantien war eine signifikante Korrelation zwischen inhibitorischer Potenz und spektraler Dissoziationskonstante nicht festzustellen.

E) ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wechselwirkung von 4-Hydroxy-Cumarinderivaten (4-HCD) mit Cytochrom P-450 an phenobarbitalstimulierten Rattenlebermikrosomen *in vitro* untersucht.

Zur Frage der Beeinflussung des mikrosomalen Arzneimittelstoffwechsels durch 4-Hydroxy-Cumarinantikoagulantien wurden zunächst am Beispiel einer Modellreaktion, der oxydativen Demethylierung von p-Nitroanisol, enzymkinetische Messungen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß die pNA-Demethylierung durch 4-Hydroxy-Cumarinderivate signifikant ($p < 0.001$) gehemmt wird. Das Ausmaß der inhibitorischen Potenz war bei den fünf untersuchten 4-Hydroxy-Cumarinderivaten unterschiedlich. Während Dicoumarol sich in allen Untersuchungen als der stärkste Inhibitor erwies, die mittlere prozentuale Hemmung betrug bei einer Substrat- bzw. Inhibitorkonzentration von 0,1 mM 57 %, zeigte Warfarin stets die geringste inhibitorische Wirkung auf die pNA-Demethylierung, sie betrug im arithmetischen Mittel 14 %. Zwischen Dicoumarol und Warfarin lagen in der Rangfolge des inhibitorischen Effektes Ethylbiscoumacetat mit 34 %, Acenocoumarol mit 25 % und Phenprocoumarol mit 22 % Hemmung.

Die aus den gemessenen pNA-Umsätzen errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden in nMol pNP/mg Mikrosomen x min. angegeben. Sie betrugen für die Kontrolle (NaOH) $2,53 \pm 0,37$, für Warfarin $2,17 \pm 0,36$, für Phenprocoumarol $1,98 \pm 0,27$, für Acenocoumarol $1,91 \pm 0,29$, für Ethylbiscoumacetat $1,66 \pm 0,25$ und für Dicoumarol $1,10 \pm 0,25$ nMol pNP/mg Prot. x min.

Zur Frage der Bindung von 4-HCD an Cytochrom P-450 wurden spektralanalytische Untersuchungen an phenobarbitalstimulierten Rattenlebermikrosomen durchgeführt. Die oxydativen Differenzspektren der 4-HCD Phenprocoumarol, Warfarin, Acenocoumarol, Ethylbiscoumacetat und Dicoumarol wurden registriert. Dabei zeigten sich der unterschiedlichen chemischen Grundstruktur entsprechend analoge spektrale Eigenschaften der 4-HCD.

Die von ihrer Grundstruktur als sogenannte " Monocumarine " bekannten Substanzen Phenprocoumarol, Warfarin und Acenocoumarol ließen sich eindeutig der Gruppe der Pharmaka zuordnen, welche spektrale Veränderungen vom Typ II hervorrufen, während die " Dicumarine " Ethylbiscoumacetat und Dicoumarol ein Typ I- bzw. modifiziertes Typ I-Spektrum erkennen ließen.

Die Bindung der 4-HCD an oxydiertes Cytochrom P-450 wurde quantitativ geprüft, wobei sich eine nahezu lineare Abhängigkeit des Ausmaßes der spektralen Veränderungen von der Substratkonzentration bei doppeltreziproker Darstellung nachweisen ließ. Die von uns ermittelten spektralen Dissoziationskonstanten (K_s) betrugen: Phenprocoumarol $1,51 \pm 0,13 \mu\text{M}$, Acenocoumarol $3,44 \pm 0,33 \mu\text{M}$, Warfarin $45,5 \pm 6,2 \mu\text{M}$, Ethylbiscoumacetat $2,81 \pm 0,36 \mu\text{M}$ und Dicoumarol $4,89 \pm 0,84 \mu\text{M}$.

LITERATURVERZEICHNIS

- AGGELER, P. M., O'REILLY, R. A., LEONG, L., KOWITZ, P. E.:
Potentiation of anticoagulant effect of warfarin by
phenylbutazone. *New Engl. J. Med.* 276, 496 (1967)
- AGGELER, P. M., O'REILLY, R. A.: Effect of heptabarbital on
the response to bishydroxycoumarin in man. *J. Lab.*
Clin. Med. 74, 229 (1969)
- AHMAD, S.: Drug interactions with oral anticoagulants.
Postgrad. Med. 67, 47 (1980)
- ALVARES, A. P., SCHILLING, G., LEVIN, W., KUNTZMAN, R.:
Studies on the induction of co-binding pigments in
liver microsomes by phenobarbital and 3-methylcho-
lanthrene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29, 521
(1967)
- ANDERS, M. W.: Enhancement and inhibition of microsomal
drug metabolism. *Drug Research* 17, 11 (1973)
- ANTLITZ, A. M., MEAD, J. A., TOLENTINO, M. A.: Potentiation
of oral anticoagulant therapy by acetaminophen. *Curr.*
Ther. Res. 10, 501 (1968 a)
- ANTLITZ, A. M., TOLENTINO, M. A., KOSAI, M. F.: Effect of
butabarbital on orally administered anticoagulants.
Curr. Ther. Res. 10, 70 (1968 b)
- AVELLANEDA, M.: Interferencia de los barbituricos en la
accion del tromexan. *Medicina (B. Aires)* 15, 109 (1955)
- AXELROD, J.: The enzymatic deamination of amphetamine (benze-
drine). *J. Biol. Chem.* 214, 753 (1955)
- BJORNSSON, T. D. et al.: Interaction of clofibrate with
warfarin. I. Effect of clofibrate on the disposi-
tion of the optical enantiomorphs of warfarin.
J. Pharmacokinet. Biopharm. 5 (5), 495 (1977)
- BOBIS, A. R., BRODIE, M. J., KAHN, G. C., DAVIES, D. S.:
Evidence for more than one of cytochrome P-450 in
hepatic microsomal fractions of human liver samples.
In: *Microsomes, drug oxidations, and chemical*
carcinogenesis, p. 957. Ed. by COON et al. Academic
Press. New York (1980)

- BOEKHOUT-MUSSERT, R. J. et al.: Inhibition by rifampicin of the anticoagulant effect of phenprocoumon. J. Amer. Med. Ass. 229, 1903 (1974)
- BRODIE, B. B., BURNS, J. J., MARLE, L. C., LIEF, P. A., BERNSTEIN, E., PAPPER, E. M.: The fate of pento-barbital in man and dog and a method for its estimation in biological materials. J. Pharmacol. Exp. Ther. 109, 26 (1953)
- BRODIE, B. B., AXELROD, J., COOPER, J. R., GAUDETTE, L., LA DU, B. N., MITOMA, C., UDENFRIED, S.: Detoxication of drugs and other foreign compounds by liver microsomes. Science 121, 603 (1955)
- BRODIE, B. B., GILLETTE, J. R., LA DU, B. N.: Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds. Ann. Rev. Biochem. 27, 427 (1958)
- CAMMER, W., SCHENKMAN, J. B., ESTABROOK, R. W.: EPR measurements of substrate interaction with cytochrome P-450. Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 264 (1966)
- CARTER, S. A.: Potentiation of the effect of orally administered anticoagulants by phenylramidolehydrochloride. New Engl. J. Med. 273, 423 (1965)
- CHRISTENSEN, L. K., SKOVSTED, L.: Inhibition of drug metabolism by chloramphenicol. Lancet 2, 1397 (1969)
- CHRISTENSEN, F., WISSING, F.: Inhibition of microsomal drug-metabolizing enzymes from rat liver by various 4-hydroxycoumarin derivatives. Biochem. Pharmacol. 21, 975 (1972)
- CHRISTENSEN, F.: Metabolism of dicoumarol by liver microsomes from untreated and phenobarbital treated rats. Biochem. Pharmacol. 21, 2303 (1972)
- CLAUDE, A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 39, 398 (1938); zit. nach CLAUDE, A.: Microsomes, endoplasmatic reticulum and interactions of cytoplasmatic membranes. In: Microsomes and drug oxidations, p. 3. Ed. by GILLETTE et al. Academic Press. New York (1969)

- COHEN, B. S., ESTABROOK, R. W.: Microsomal electron transport reactions. I. Interaction of reduced triphosphopyridine nucleotide during the oxidative demethylation of aminopyrine and cytochrome b₅ reduction. *Archs. Biochem. Biophys.* 143, 37 (1971)
- CONNEY, A. H., MILLER, E. C., MILLER, J. A.: The metabolism of methylated aminoazo dyes. V. Evidence for induction of enzyme synthesis in the rat by 3-methylcholanthrene. *Cancer Res.* 16, 450 (1956)
- CONNEY, A. H., DAVISON, C., GASTEL, R., BURNS, J. J.: Adaptive increases in drug metabolizing enzymes induced by phenobarbital and other drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 130, 1 (1960)
- CONNEY, A. H., GILMAN, A. G.: Puromycin inhibition of enzyme induction by 3-methylcholanthrene and phenobarbital. *J. Biol. Chem.* 238, 3682 (1963)
- CONNEY, A. H.: Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol. Rev.* 19, 317 (1967)
- CONNEY, A. H.: Enzyme induction in humans. Symposium Drug interaction and enzyme induction by drugs. *Fédération Internationale Pharmaceutique*, 29e Congr. Internat. des Sciences Pharmaceutiques, Londres 1-12 Sept. 1969
- CONNEY, A. H.: Perspectives and challenges. In: *Microsomes, drug oxidations, and chemical carcinogenesis*, p. 1103. Ed. by COON et al. Academic Press, New York (1980)
- COOPER, D. Y., LEVINE, S., NARASIMHULU, S., ROSENTHAL, O., ESTABROOK, R. W.: Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science* 147, 400 (1965)
- COOPER, D. Y. et al.: A revaluation of the role of cytochrome P-450 as the terminal oxidase in hepatic microsomal mixed function oxidase catalysed reactions. *Drug. Metab. Rev.* 10(2), 153 (1979)
- CORN, M.: Effect of phenobarbital and glutethimide on biological half-life of warfarin. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 16, 606 (1966)

- CORREIA, M. A., MANNERING, G. J.: Reduced diphosphopyridine nucleotide synergism of the reduced triphosphopyridine nucleotide-dependent mixed-function oxidase system of hepatic microsomes. I. Effect of activation and inhibition of the fatty acyl coenzyme A desaturation system. *Mol. Pharmacol.* 9, 455 (1973)
- CUCINELL, S. A., CONNEY, A. H., SANSUR, M., BURNS, J. J.: Drug interaction in man. I. Lowering effect of phenobarbital on plasma levels of bishydroxycoumarin (Dicoumarol) and diphenylhydantoin (Dilantin). *Clin. Pharmacol. Ther.* 6, 420 (1965)
- CUCINELL, S. A., ODESSKY, L., WEISS, M., DAYTON, P. G.: The effect of chloral hydrate on bishydroxycoumarin metabolism. *J. Amer. Med. Ass.* 197, 366 (1966)
- CULLEN, S. J., CATALANO, P. M.: Griseofulvin-warfarin antagonism. *J. Amer. Med. Ass.* 199, 582 (1967)
- DALLNER, G., SIEKEVITZ, P., PALADE, G. E.: Biogenesis of endoplasmatic reticulum membrane. II. Synthesis of consecutive microsomal enzymes in developing rat hepatocyte. *J. Cell. Biol.* 30, 97 (1966)
- DAYTON, P. G., TARGAN, Y., CHENKIN, T., WEINER, M.: The influence of barbiturates on coumarin plasma levels and prothrombine response. *J. Clin. Invest.* 40, 1797 (1961)
- DECKERT, F. W., REMMER, H. K.: In vitro inhibition of rat and human liver microsomal enzymes by 4-hydroxycoumarin anticoagulants and related compounds. *Chem.-Biol. Interactions*, 5, 255 (1972)
- DI AUGUSTINE, R. P., ELING, T. E., FOUTS, J. R.: The interaction of a fluorescent probe with rat hepatic microsomes. *Chem.-Biol. Interactions* 2, 17 (1970)
- DIETERLE, et al.: Biotransformation and pharmacokinetics of acenocoumarol (Sintrom^R). *Europ. J. Pharmacol.* 11, 367 (1977)
- ERNSTER, L., ORRENIUS, S.: Substrate-induced synthesis of the hydroxylating enzyme system of liver microsomes. *Fed. Proc.* 24, 1190 (1965)

- ESTABROOK, R. W., COOPER, D. Y., ROSENTHAL, O.: The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C-21-hydroxylase system of adrenal cortex. *Biochem. Z.* 338, 741 (1963)
- ESTABROOK, R. W., COHEN, B.: Organization of the microsomal electron transport system. In: *Microsomes and drug oxidation*, p. 95. Ed. by GILLETTE et al. Academic Press. New York (1969)
- FASCO, M. J., PIPER, L. J., KAMINSKY, L. S.: Binding of R and S warfarin to hepatic microsomal cytochrome P-450. *Arch. Biochem. Biophys.* 182, 379 (1977)
- FASCO, M. J., VATSIS, K. P., KAMINSKY, L. S., COON, M. J.: Regioselective and stereoselective hydroxylation of R and S warfarin by different forms of purified cytochrome P-450 from rabbit liver. *J. Biol. Chem.* 253 (21), 7813 (1978)
- FEUER, G.: Induction of drug-metabolizing enzymes of rat liver by derivatives of coumarin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 48, 232 (1970)
- FEUER, G.: The metabolism and biological actions of coumarins. *Prog. Med. Chem.* 10, 85 (1974)
- FOUTS, J. R.: The metabolism of drugs by subfractions of hepatic microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 6, 373 (1961)
- FOUTS, J. R., ROGERS, L. A.: Morphological changes in the liver accompanying stimulation of microsomal drug metabolizing enzyme activity by phenobarbital, chlordane, benzpyrene, or methylcholanthrene in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 147, 112 (1965)
- FOUTS, J. R. et al.: The interaction of a fluorescent probe with rat hepatic microsomes. *Chem.-Biol. Interactions* 2, 17 (1970)
- FOUTS, J. R.: Some morphological characteristics of hepatocyte endoplasmatic reticulum and some relationships between endoplasmatic reticulum, microsomes and drug metabolism. *Handbook of experimental Pharmacology XX VIII/2*, 243 (1971)

- FEINMAN, M.: The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance. J. Am. Statist. Assoc. 32, 675 (1937)
- GARFINKEL, D.: Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. Archs. Bioch. Biophys. 77, 493 (1958)
- GARRETSON, L. K., PEREL, J. M., DAYTON, P. G.: Methylphenidate interaction with both anticonvulsants and ethylbiscoumacetate. J. Am. Med. Ass. 207, 2053 (1969)
- GAZZANIGA, A. B., STEWART, D. R.: Possible quinidine induced hæmorrhage in a patient on warfarin sodium. New Engl. J. Med. 280, 711 (1969)
- GELBOIN, H. V., SOKOLOFF, L.: Effects of 3-methylcholanthrene and phenobarbital on amino acid incorporation into protein. Science 134, 611 (1961)
- GELBOIN, H. V., BLACKBURN, N. R.: The stimulatory effect of 3-methylcholanthrene on benzpyrene hydroxylase activity in several rat tissues: Inhibition by actinomycin D and puromycin. Cancer Res. 24, 356 (1964)
- GELBOIN, H. V., WORTHAM, J., WILSON, R. G.: 3-methylcholanthrene and phenobarbital stimulation of rat liver RNA polymerase. Nature (London) 214, 281 (1967)
- GIGON, P. L., GRAM, T. E., GILLETTE, J. R.: Studies on the rate of reduction of hepatic microsomal cytochrome P-450 by reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: effect of drug substrates. Mol. Pharmacol. 5, 109 (1969)
- GILLETTE, J. R., KAMM, J. J.: The enzymatic formation of sulfoxides: the oxidation of chlorpromazine and 4,4'-diaminodiphenyl sulfide by guinea pig liver microsomes. J. Pharmacol. Exp. Ther. 130, 262 (1960)
- GILLETTE, J. R., GRAM, T. E.: Cytochrome P-450 reduction in liver microsomes and its relationship to drug metabolism. In: Microsomes and drug oxidations, p. 133. Ed. by GILLETTE et al. Academic Press. New York (1969)
- GILLETTE, J. R., DAVIS, D. C., SASAMEN, H. A.: Cytochrome P-450 and its role in drug metabolism. Ann. Rev. Pharmacol. 12, 57 (1972)

- GLOGNER, P.: Anticoagulant interactions (Ungünstige und problematische Arzneimittelkombinationen. II -Antikoagulantien). Internist 11, 260 (1970)
- GROSS, J. E., DICKHAUS, D. W.: Increased bishydroxycoumarin requirements in patients receiving phenobarbital. New Engl. J. Med. 273, 1094 (1965)
- GUENG AICH, F. P.: Separation and purification of multiple forms of microsomal cytochrome P-450. J. Biol. Chem. 243, 7931 (1978)
- GUGLER, A., DENGLE, H. J.: Arzneimittelinteraktionen mit oralen Antikoagulantien vom Cumarintyp. Klin. Wschr. 51, 1081 (1973)
- HADDICK, R. E. et al.: Biotransformation of phenprocoumon in the rat. J. Med. Chem. 18, 519 (1975)
- HAGUE, D. E. et al.: The effect of methylphenidate and prolintane on the metabolism of ethylbiscoumacetate. Clin. Pharmacol. Ther. 12, 259 (1971)
- HANSEN, J. M., KRISTENSEN, M., SKOVSTED, L., CHRISTENSEN, L. K.: Dicoumarol-induced diphenylhydantoin intoxication. Lancet 2, 265 (1966)
- HANSEN, J. M., et al.: Effect of diphenylhydantoin on the metabolism of dicoumarol in man. Acta Med. Scand. 189, 15 (1971 a)
- HANSEN, J. M., et al.: Carbamazepine-induced acceleration of diphenylhydantoin and warfarin metabolism in man. Clin. Pharmacol. Ther. 12, 539 (1971 b)
- HANSEN, J. M., et al.: Potentiations of warfarin by co-trimoxazole. Br. Med. J. 2, 684 (1975)
- HANSTEN, P. D.: Drug interactions, 4. Aufl. Philadelphia: Lea and Febiger (1979)
- HAYASHI, O., ROTHBERG, S., MEHLER, A. H.: Studies on enzymatic oxygenation. 130 th Ann. Chem. Soc. Meeting (1956), p. 53
- HAYASHI, O.: The Oxygenases, ed. by HAYASHI, O., Academic Press, New York (1962) p. 588
- HELD, H.: Drug interactions with oral anticoagulants of the coumarin type. Med. Monatsschr. Pharm. 33, 8 (1980)

- HELD, H., SCHUNTER, C.: Arzneimittelinteraktionen mit Cumarinen. Dtsch. Med. Wschr. 102, 355 (1977)
- HILDEBRANDT, A., REMMER, H., ESTABROOK, R. W.: Cytochrome P-450 of liver microsomes - one pigment or many. Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 607 (1969)
- HILDEBRANDT, A., ESTABROOK, R. W.: Evidence for the participation of cytochrome b_5 in hepatic microsomal mixed function oxidation reactions. Archs. Biochem. Biophys. 143, 66 (1971)
- HÜTHWOHL, B., JÄHNCHEN, E., KAHL, G. F., STAMM, H., WEBER, W.: Inhibition of microsomal drug metabolism by coumarin compounds. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 274, R 57 (1972)
- HUNNINGHAKE, D. B., AZARNOFF, D. L.: Drug interactions with warfarin. Arch. Intern. Med. 121, 349 (1968)
- HUSTED, S., ANDREASEN, F., FOGED, L.: Increased sensitivity to phenprocoumon during methyltestosterone therapy. Europ. J. Clin. Pharmacol. 10, 209 (1976)
- ICHIKAWA, Y., YAMANO, T.: Reconversion of detergent- and sulfhydryl reagent-produced P-420 to P-450 by polyols and glutathione. Biochem. Biophys. Acts 131, 490 (1967)
- IKEDA, M., ULLRICH, V., STAUDINGER, H. J.: Metabolism in vitro of warfarin by enzymic and nonenzymic systems. Biochem. Pharmacol. 17, 1663 (1968)
- IMAI, Y., SATO, R.: Substrate interaction with hydroxylase system in liver microsomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 22, 620 (1966)
- IMAI, Y., SATO, R.: Studies on the substrate interactions with P-450 in drug hydroxylation by liver microsomes. J. Biochem. 62, 239 (1967 a)
- IMAI, Y., SATO, R.: Anomalous spectral interactions of reduced P-450 with ethyl isocyanide and some other lipophilic ligands. J. Biochem. 62, 464 (1967 b)
- IMAI, Y., SATO, R.: Conversion of P-450 to P-420 by neutral salts and other reagents. Europ. J. Biochem. 1, 419 (1967 c)

- JÄHNCHEN, E., MEINERTZ, T., GILFRICH, H.-J., GROTH, U., MARTINI, A.: The enantiomers of phenprocoumon: pharmacodynamic and pharmacokinetic studies. Clin. Pharmacol. Ther. 20, 342 (1976 a)
- JÄHNCHEN, E., MEINERTZ, T., GILFRICH, H.-J., GROTH, U.: Pharmacokinetic analysis of the interaction between dicoumarol and tolbutamide in man. Europ. J. Clin. Pharmacol. 10, 349 (1976 b)
- JÄHNCHEN, E., MEINERTZ, T., GILFRICH, H.-J.: Interaction of allopurinol with phenprocoumon in man. Klin. Wschr. 55, 759 (1977)
- JÄHNCHEN, E., MEINERTZ, T.: Pharmakokinetische Aspekte der Überdosierung und Intoxikation mit oralen Antikoagulantien. Drug Res. 27 (II), 9b, 1849 (1977)
- KAHL, G. F.: Veränderung der Abbaugeschwindigkeit von Arzneimitteln und ihre Bedeutung für die Pharmakotherapie. Klin. Wschr. 49, 384 (1971)
- KAHL, G. F.: Wechselwirkungen zwischen Arzneimitteln. Tögl. Prax. 15, 585 (1974)
- KAHL, G. F.: Interaktionen von Arzneimitteln: Ein Problem bei der Therapie. Internist 19, 366 (1978)
- KAHL, G. F., FRIEDERICI, D. E., BIGELOW, S. W., OKEY, A. B., NEBERT, D. W.: Ontogenetic expression of regulatory and structural gene products associated with the Ah locus. Dev. Pharmacol. Ther. I. 137 (1980)
- KAHL, R., KAHL, G. F.: Entgiftung und Aktivierung von Arzneimitteln und Fremdstoffen: Rolle verschiedener Cytochrome P-450. Pharmazie heute, 3, 93 (1981)
- KAMIN, H., MASTERS, B. S. S., GIBSON, Q. H., WILLIAMS, C. H.: Microsomal TPNH-cytochrom c-reductase. Fed. Proc. 24, 1164 (1964)
- KAMINSKY, L. S., PASCO, M. J., GUENGERICH, F. P.: Comparison of different forms of liver, kidney, and lung microsomal cytochrome P-450 by immunological inhibition of regio- and stereoselective metabolism of warfarin. J. Biol. Chem. 254, 9657 (1979)

KAMINSKY, L. S., FASCO, M. J., GUENGERICH, F. P.:

Comparison of different forms of purified cytochrome P-450 from rat liver by immunological inhibition of regio- and stereoselective metabolism of warfarin. J. Biol. Chem. 255, 85 (1980)

KAMINSKY, L. S., FASCO, M. J., GUENGERICH, F. P.:

Warfarin metabolism - a probe of purified rat liver cytochromes P-450. In: Microsomes, drug oxidations, and chemical carcinogenesis, p. 147. Ed. by COON et al., Academic Press, New York (1980)

KATAGIRI, M., GANGULI, B. N., GUNSALUS, I. C.: A soluble cytochrome P-450 functional in methylene hydroxylation. J. Biol. Chem. 243, 3543 (1968)

KAZMIER, F. J.: A significant interaction between metronidazole and warfarin. Mayo Clin. Proc. 51, 782 (1976)

KEILIN, D., HARTREE, E. F.: Succinic dehydrogenouscytochrome system of cells. Proc. Roy. Soc. B 129, 277 (1940)

KINOSHITA, T., HORIE, S.: Studies on P-450. III. On the absorption spectrum of P-450 in rabbit liver microsomes. J. Biochem. 61, 26 (1967)

KLINGENBERG, M.: Pigments of rat liver microsomes. Arch. Biochem. Biophys. 75, 376 (1958)

KOCH-WESER, J., SELLERS, E. M.: Drug interactions with coumarin anticoagulants. I. New Engl. J. Med. 285, 487 (1971 a)

KOCH-WESER, J., SELLERS, E. M.: Drug interactions with coumarin anticoagulants. II. New Engl. J. Med. 285, 547 (1971 b)

KOCH-WESER, J.: Hemorrhagic reactions and drug interactions in 500 warfarin-treated patients. Clin. Pharmacol. Ther. 14, 139 (1973)

KOCH-WESER, J.: Drug interactions during oral anticoagulant therapy. In: N. V. Dimitrov, J. H. Nodine (Hrsg.): Drugs and hemetologic reactions, S. 297, New York: Grune and Stratton (1974)

KRATZ, F., STAUDINGER, H. J.: Kinetische Untersuchungen zur Hydroxylierung von Cumarin mit Lebermikrosomen von Kaninchen. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 343, 27 (1965)

- KRATZ, F., STAUDINGER, H. J.: Zur Frage der Induzierbarkeit mikrosomaler Enzyme am Beispiel der Cumarinhydroxylierung in der Kaninchenleber. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 568 (1967)
- KRATZ, F., STAUDINGER, H.: Spektrale Änderungen von Kaninchenlebermikrosomen durch Cumarin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 455 (1968)
- KRISTENSEN, M., HANSEN, J. M., HELLERUP, M. D.: Potentiation of the tolbutamide effect by dicoumarol. Diabetes 16, 211 (1967)
- KRISTENSEN, M., HANSEN, J. M. et al.: Accumulation of chlorpropamide caused by dicoumarol. Acta Med. Scand. 183, 83 (1968)
- KUNTZMAN, R.: Drugs and enzyme induction. Ann. Rev. Pharmacol. 9, 21 (1969)
- IAI et al.: Relationship between dicoumarol distribution and the effect of enzyme induction on dicoumarol elimination in rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 199, 74 (1976)
- LAUNGBURY, A. P.: Drug interactions. Am. J. Hosp. Pharmacol. 23, 24 (1966)
- LEE, F. H. et al.: Metabolism of dicoumarol 14 C by rat liver microsomes. Pharmacol. Res. Commun. 8, (5), 469 (1976)
- LETTER: Potentiations of warfarin by cotrimoxazole. Br. Med. J. 2, 5972 (1975)
- LEVIN, W., BOTELHO, L. H., THOMAS, P. E., RYAN, D. E.: Characterization of three forms of rat hepatic cytochrome P-450: evidence for separate gene products. In: Microsomes drug oxidations, and chemical carcinogenesis, p. 47. Ed. by COON et al. Academic Press, New York (1980)
- LEWIS, R. J., TRAGER, W. F.: Warfarin metabolism in man: identification of metabolites in urine. J. Clin. Invest. 49, 907 (1970)
- LEWIS, R. J. et al.: Warfarin, stereochemical aspects of its metabolism and the interaction with phenylbutazone. J. Clin. Invest. 53, 1607 (1974)

- LEYBOLD, K., STAUDINGER, H. J.: Geschlechtsunterschiede im Stereoidstoffwechsel von Rattenlebermikrosomen. *Biochem. Zschr.* 331, 389 (1959)
- LIER, A.: Zur Frage der Beeinflussung des oxydativen und reduktiven Fremdstoffumbaues in den Mikrosomen der Rattenleber durch Metyrapon. *Med. Diss. Mainz* 1973
- LINWEAVER, H., BURK, D.: The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.* 56, 658 (1934)
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951)
- Mc DONALD, M. G., ROBINSON, D. S., FAEFFE, J. J., SYLVESTER, D.: The effects of phenobarbital, glutethimide and chloral betaine on plasma half life and anticoagulant action of warfarin in man. *Pharmacologist* 9, 191 (1967)
- Mc DONALD, M. G., ROBINSON, D. S.: Clinical observations of possible barbiturate interference with anti-coagulation. *J. Amer. Med. Ass.* 204, 95 (1968)
- Mc DONALD, M. G., ROBINSON, D. S., SYLVESTER, D.: The effects of phenobarbital, chloral betaine, and glutethimide administration on warfarin plasma levels and hypoprothrombinemic responses in man. *Clin. Pharmacol. Ther.* 10, 80 (1969)
- Mc DONALD et al.: Development of the hepatic mixed-function oxidase system and its metabolism of warfarin in the perinatal rat. *Dev. Pharmacol. Ther.* 3, 1 (1981)
- MANNERING, G. J., DIXON, A. C., BAKER, E. M., ASAMI, T.: The in vivo liberation of morphine from codeine in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 111, 142 (1954)
- MANNERING, G. J.: Role of substrate binding to P-450 hemoproteins in drug metabolism. In: *Drugs and cell regulations*, p. 197. Academic Press, New York (1971 a)
- MANNERING, G. J.: Inhibition of drug metabolism. In: *Concepts in Biochemical Pharmacology*. Ed. by BRODIE, B. B., GILLETTE, J. R., *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, New York: Springer Verlag XXVIII/2, p. 452 (1971 b)

- MASON, H. S.: Mechanism of oxygen metabolism. *Advances Enzymol.* 19, 19 (1957)
- MASON, H. S., NORTH, J. C., VANNESTE, N.: Microsomal mixed-function oxidations: the metabolism of xenobiotics. *Fed. Proc.* 24, 1172 (1965)
- MEIS, G.: Einfluß von Cumarinderivaten auf die Aktivität mikrosomaler Fremdstoffhydroxylasen. *Med. Diss.* Mainz 1973.
- MIKI, N., SUGIYAMA, T., YAMANO, T.: Purification and some properties of cytochrome P-450 with high affinity for cytochrome b₅. In: *Microsomes, drug oxidations, and chemical carcinogenesis*, p. 27. Ed. by COON et al. Academic Press, New York (1980)
- MITOMA, C., UDENFRIED, S.: Enzymatic hydroxylation of aromatic drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 113, 40 (1955)
- MITOMA, C., POSNER, H. C., REITZ, H. C., UDENFRIED, S.: Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Archs. Biochem. Biophys.* 61, 431 (1956)
- MIYAKE, Y., GAYLOR, J. L., MASON, H. S.: Properties of a submicrosomal particle containing P-450 and flavoprotein. *J. Biol. Chem.* 243, 5788 (1968)
- MUTSCHLER, E.: *Arzneimittelwirkungen*, 4. Aufl. 1981, wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- NARASIMHULU, S., COOPER, D. Y., ROSENTHAL, O.: Spectrophotometric properties of a triton clarified steroid 21-hydroxylase system of adrenocortical microsomes. *Life Sci.* 4, 2101 (1965)
- NEBERT, D. W.: Multiple forms of inducible drug-metabolizing enzymes. A reasonable mechanism by which any organism can cope with adversity. *Moll. Cell. Biochem.* 27, 27 (1979)
- NETTER, K. J.: Eine Methode zur direkten Messung der o-Demethylierung und ihre Anwendung auf die Mikrosomenhemmwirkung von SKF 525-A. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac.* 238, 292 (1960)

- NETTER, K. J.: Prinzipien des Arzneimittelabbaus im Organismus. *Arzneimittelforsch.* 12, 1042 (1962)
- NETTER, K. J., SEIDEL, G.: An adaptively stimulated o-demethylating system in rat liver microsomes and its kinetic properties. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* 146, 61 (1964)
- NETTER, K. J., JENNER, S., KAJUSCHKE, K.: Über die Wirkung von Metyrapon auf den mikrosomalen Arzneimittelabbau. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac.* 259, 1 (1967)
- NETTER, K. J.: Grundlagen des Arzneimittelstoffwechsels. *Arzneimittelforsch.* 22, 285 (1972)
- OAKLEY, D. P., LAUTCH, H.: Haloperidol and anticoagulant treatment. *Lancet* 1, 1231 (1963)
- OMURA, T., SATO, R.: A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 237, 1375 (1962)
- OMURA, T., SATO, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239, 2370 (1964 a)
- OMURA, T., SATO, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties. *J. Biol. Chem.* 239, 2379 (1964 b)
- OMURA, T., COOPER, D. Y., ROSENTHAL, O., ESTABROOK, R. W.: Functions of cytochrome P-450 of microsomes. *Fed. Proc.* 24, 1181 (1965)
- OMURA, T., SANDERS, E., ESTABROOK, R. W.: Isolation from adrenal cortex of a nonheme iron protein and a flavo-protein functional as a reduced triphosphopyridine nucleotide-cytochrome P-450-reductase. *Archs. Bioch. Biophys.* 117, 660 (1966)
- O'REILLY, R. A.: Potentiation of anticoagulant effect by disulfiram. *Clin. Res.* 19, 180 (1971)
- O'REILLY, R. A.: Interaction of sodium warfarin and disulfiram (Antabuse^R) in man. *Ann. Intern. Med.* 78, 73 (1973)

- O'REILLY, R. A.: Interaction of chronic daily warfarin therapy and rifampin. *Ann. Intern. Med.* 83, 506 (1975)
- O'REILLY, R. A.: The stereoselective interaction of warfarin and metronidazole in man. *N. Engl. J. Med.* 295, 354 (1976)
- ORME, M. et al.: Warfarin and distalgesic interaction. *Br. Med. J.* 1, 200 (1976)
- ORRENIUS, S., ERNSTER, L.: Phenobarbital-induced synthesis of the oxydative demethylating enzymes of rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16, 60 (1964)
- PALADE, G. E.: Electron microscopy of mitochondria and other cytoplasmic structures. In: GAEBLER, O. H. (Ed.): *Enzymes, units of biological structure and function*. Academic Press, New York 1956, p. 185
- PAPPENHEIMER, A. M., jr., WILLIAMS, C. M.: Cytochrome b_5 and the dihydrocoenzyme oxidase system in the cecropia silkworm. *J. Biol. Chem.* 209, 915 (1954)
- PETERS, M. A., FOUTS, J. R.: The inhibitory effect of aureomycin (chlortetracycline) pretreatment on some rat liver microsomal enzyme activities. *Biochem. Pharmacol.* 18, 1511 (1969)
- PECHTHOLD, F.: Zur Kenntnis des Abbaues von Dimethylaminophenyldimethylpyrazolon im Organismus. *Arzneimittelforsch.*, Aulendorf 14, 972 (1964)
- PETERSON et al.: Evidence, that purified liver microsomal cytochrome P-450 is a one electron acceptor. *J. Biol. Chem.* 252, 4431 (1977)
- POHL, L. R. et al.: Biotransformation of phenprocoumon in rat. *J. Med. Chem.* 18, 519 (1975)
- POHL, L. R., NELSON, S. D., PORTER, W. R., TRAGER, W. F.: Warfarin - stereochemical aspects of its metabolism by rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 25, 2153 (1976)

- POHL, L. R., PORTER, W. R., TRAGER, W. F.: Stereochemical biotransformation of warfarin as a probe of the homogeneity and mechanism of microsomal hydroxylases. *Biochem. Pharmacol.* 26, 109 (1977)
- POSNER, H. S., MITOMA, C., ROTHBERG, S., UDENFRIED, S.: Enzymic hydroxylation of aromatic compounds. III. Studies on the mechanism of microsomal hydroxylation. *Archs. Biochem. Biophys.* 94, 280 (1961)
- RAACKE, I. D.: The synthesis of proteins. In: GREENBERG, D. M. (Ed.): *Metabolic Pathways*, Vol. 2, New York and London 1961, p. 263
- RAMANKIEWICZ, J. A., EHRMANN, M.: Rifampin and warfarin: a drug interaction. *Ann. Intern. Med.* 82, 224 (1975)
- REMMER, H.: Die Beschleunigung des Abbaues als Ursache der Gewöhnung an Barbiturate. *Naturwissenschaften* 46, 580 (1959 a)
- REMMER, H.: Der beschleunigte Abbau von Pharmaka in den Lebermikrosomen unter dem Einfluß von Luminal. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pharmacol.* 235, 279 (1959 b)
- REMMER, H., MERKER, H. J.: Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem Reticulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital (Luminal). *Klin. Wschr.* 41, 276 (1963)
- REMMER, H., MERKER, H. J.: Effect of drugs on the formation of smooth endoplasmatic reticulum and drug metabolizing enzymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 123, 79 (1965)
- REMMER, H., SCHENKMAN, J. B., ESTABROOK, R. W., SASAME, H., GILLETTE, J., NARASIMHULU, S., COOPER, D. Y., ROSENTHAL, O.: Drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Molec. Pharmacol.* 2, 187 (1966)
- REMMER, H., SCHENKMAN, J. B., GREIM, H.: Spectral investigations on cytochrome P-450. In: *Microsomes and drug oxidations*, p. 371. Ed. by GILLETTE et al., Academic Press, New York (1969)

- ROBINSON, D. S., Mc DONALD, M. G.: the effect of phenobarbital administration on the control of coagulation achieved during warfarin therapy in man. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 153, 250 (1966)
- ROBINSON, D. S., SYLVESTER, D.: Interaction of commonly prescribed drugs and warfarin. *Ann. Intern. Med.* 72, 853 (1970)
- ROGERS, L. A., FOUTS, J. R.: Some of the interactions of SKF 525-A with hepatic microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 146, 286 (1964)
- ROSENTHAL, A. R. et al.: Interaction of isoniazid and warfarin. *J. Amer. Med. Ass.* 238, 2177 (1977)
- ROTHSTEIN, E.: Warfarin effect enhanced by disulfiram. *J. Amer. Med. Ass.* 206, 1574 (1968)
- ROTHSTEIN, E.: Warfarin effect enhanced by disulfiram. *J. Amer. Med. Ass.* 22, 1052 (1972)
- RYAN et al.: Purification of cytochrome P-450 and P-448 from rat liver microsomes. *Methods Enzymol.* 52, 117 (1978)
- RYAN, D. E., THOMAS, P. E., KORZENIOWSKI, D., LEVIN, W.: Separation and characterization of highly purified forms of liver microsomal cytochrome P-450 from rats treated with polychlorinated biphenyls, phenobarbital, and 3-methylcholanthrene. *J. Biol. Chem.* 254, 1365 (1979)
- SACHS, L.: Statistische Auswertungsmethoden. 3. Edition Verlag Springer, Berlin, Heidelberg, 1971
- SATO, R., NISHIBAYASHI, H., ITO, A.: Characterization of two hemoproteins of liver microsomes. In: *Microsomes and drug oxidations*, p. 111. Eds. GILLETTE, J. R. et al. Academic Press, New York (1969)
- SCHENKMAN, J. B., REMMER, H., ESTABROOK, R. W.: Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Molec. Pharmacol.* 3, 113 (1967)
- SCHENKMAN, J. B., CINTI, D. L., MOLDENS, P., ORRENIUS, S.: Newer aspects of substrate binding to cytochrome P-450. *Drug Metab. Dispos.* 1, 111 (1973)

- SCHMIDT, W. et al.: Effect of induction and inhibition of drug metabolism on pharmacokinetics and anticoagulant activity of the enantiomers of phenprocoumon in rats. *Pharmacology* 21, 313 (1980)
- SELF, T. H. et al.: Interaction of rifampin and warfarin *Chest* 67, 490 (1975)
- SHOEMAN, D. W., VANE, F. M., MANNERING, G. J.: Induction of drug metabolism. VII. differences in P-420 hemoproteins from untreated and 3-methylcholanthrene treated rats. *Mol. Pharmacol.* 9, 372 (1973)
- SIMS, P., GROVER, P. L., SWAISLAND, A., PAL, K., HEWER, A.: Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diolepoxide. *Nature (London)* 252, 326 (1974)
- SKOVSTED, L. et al.: The effect of different oral anti-coagulants on diphenylhydantoin (DPH) and tolbutamide metabolism. *Acta Med. Scand.* 199, 513 (1976)
- SLADEK, N. E., MANNERING, G. J.: Evidence for a new P-450 hemoprotein in hepatic microsomes from methylcholanthrene treated rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 668 (1966)
- SLADEK, N. E., MANNERING, G. J.: Induction of drug metabolism. I. Differences in the mechanism by which polycyclic hydrocarbons and phenobarbital produce their inductive effects on microsomal N-demethylating systems. *Mol. Pharmacol.* 5, 174 (1969 a)
- SLADEK, N. E., MANNERING, G. J.: Induction of drug metabolism. II. Qualitative differences in the microsomal N-demethylating systems stimulated by polycyclic hydrocarbons and by phenobarbital. *Mol. Pharmacol.* 5, 186 (1969 b)
- SOLOMON, H. M., SCHROGIE, J. J.: The effect of phenylamidol on the metabolism of bishydroxycoumarin. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 154, 660 (1966)
- SOLOMON, H. M., SCHROGIE, J. J.: Effect of phenylamidol and bishydroxycoumarin on the metabolism of tolbutamide in human subjects. *Metabolism* 16, 1029, (1967)

- SPURNY, O. M., WOLF, J. W., DEVINS, G. S.: Protracted tolbutamide-induced hypoglycaemia. Arch. Intern. Med. 115, 53 (1965)
- STRITTMATTER, C. F., BALL, E. G.: A hemochromogen component of liver microsomes. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 38, 19 (1952)
- STRITTMATTER, C. F., BALL, E. G.: The intracellular distribution of cytochrome components and of oxidative enzyme activity in rat liver. J. Cellul. Comp. Physiol. 43, 57 (1954)
- STRITTMATTER, P., VELICK, F. S.: The isolation of microsomal cytochromes. J. Biol. Chem. 221, 253 (1956)
- STRITTMATTER, P.: The interaction of nucleotides with microsomal cytochrome reductase. J. Biol. Chem. 233, 748 (1958)
- THIJSSSEN, H. H., BAARS, L. G., REIJNDERS, M. J.: Der Metabolismus von Acenocoumarol und seine pharmakodynamische Bedeutung bei Ratten. Vortrag A 19: 23. Frühjahrstagung 16. - 19. März 1982 in Mainz.
- THOMAS, P. E., LU, A.Y.H., RYAN, D., WEST, S. B., KAWALEK, J. and LEVIN, W.: Immunochemical evidence for six forms of rat liver cytochrome P-450 obtained using antibodies against purified rat liver cytochromes P-450 and P-448. Mol. Pharmacol. 12, 746 (1976)
- THONNART, N. et al.: In vitro metabolism of a new 4-hydroxycoumarin anticoagulant. Structure of an unusual metabolite. J. Med. Chem. 20, 604 (1977)
- TILSTONE, W. J. et al.: Interaction between warfarin and sulphametoxazole. Postgrad. Med. J. 53, 388 (1977)
- TOWNSEND, M. G., ODAM, E. M., PAGE, J. M. J.: Studies of the microsomal drug metabolism system in warfarin-resistant and -susceptible rats. Biochem. Pharmacol. 24, 729 (1975)
- UDALL, J. A.: Drug interference with warfarin therapy. Clin. Med. 77, 20 (1970)

- UDALL, J. A.: Warfarin - chloral hydrate interaction: pharmacological activity and clinical significance. *Ann. Intern. Med.* 81, 341 (1976)
- UDALL, J. A.: Warfarin interactions with chloral hydrate and glutethimide. *Curr. Ther. Res.* 17, 67 (1975)
- UDALL, J. A.: Clinical implications of warfarin interactions with five sedatives. *Am. J. Cardiol* 35, 67 (1975)
- VERSTRAETE, M., VERMYLEN, J., CLAEYS, H.: Dissimilar effect of two anti-anginal drugs belonging to the benzofuran group on the action of coumarin derivatives. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 176, 33 (1968)
- VESELL, E. S., PASSANANTI, G. T., GREENE, F. E.: Impairment of drug metabolism in man by allopurinol and nortriptyline. *New Engl. J. Med.* 283, 1484 (1970)
- WILCOXON, F., WILCOX, R. A.: Some rapid approximate statistical procedures, Lederle Laboratories, New York (1964), pp.11 and 12.
- WILLIAMS, R. T.: Detoxication mechanisms, 2nd Ed. London: Chapman and Hall 1959
- WILLIAMS, C. H., jr., KAMIN, H.: Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrom c-reductase of liver. *J. Biol. Chem.* 237, 587 (1962)
- WILLIAMSON, D. G., O'DONNELL, V. J.: The role of cytochrome P-450 in the mechanism of inhibition of steroid 11 β -hydroxylation by dicoumarol. *Biochemistry* 8, 1300 (1969)
- WISSING, F., CHRISTENSEN, F.: The complexity of the inhibitory action of dicoumarol on the mixed function oxidase system of rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 22, 581 (1973)
- YOSHIDA, A., KUMAOKA, H.: Studies on the substrate-induced spectral change of cytochrome P-450 in liver microsomes. *J. Biochem.* 78, 55 (1975)

Lebenslauf

Am 29. 4. 1947 wurde ich als Sohn des Kraftfahrers Paul Weber und seiner Ehefrau Änni geb. Merzhäuser in Betzdorf/Sieg geboren.

In der Zeit von 1954 bis 1958 besuchte ich die katholische Volksschule in Betzdorf, danach bis 1966 das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium in Betzdorf. Am 22. 10. 1966 legte ich dort die Reifeprüfung ab.

Das Studium der Medizin nahm ich im Sommersemester 1967 an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz auf. Nach bestandener ärztlicher Vorprüfung am 8. 10. 1969 setzte ich das klinische Studium an der St. Mary's Hospital Medical School in London fort. Nach meiner Rückkehr nach Mainz führte ich noch während meiner Studentenzeit 1971/72 die experimentellen Untersuchungen zum Thema dieser Arbeit am Pharmakologischen Institut der Universität Mainz durch. Am 20. 6. 1973 schloß ich dann das Medizinstudium in Mainz mit der ärztlichen Prüfung ab.

Im Rahmen meiner Medizinalassistentenzeit war ich zunächst am Institut für Anästhesiologie bei Herrn Prof. Dr. R. Frey, danach bei Herrn Prof. Dr. Schölmerich an der II. Medizinischen Klinik der Universität Mainz und schließlich an der chirurgischen Abteilung des Herz-Jesu-Krankenhauses in Dernbach/Westerwald beschäftigt, wo ich am 1. 3. 1975 meine Ausbildung als chirurgischer Assistent begann. Den unfallchirurgischen Teil meiner Ausbildung absolvierte ich in der Zeit vom 1. 2. 1978 bis 31. 3. 1980 im St. Vinzenz-Krankenhaus in Limburg/Lahn, danach wechselte ich zum St. Vinzenz-Krankenhaus in Essen über, wo ich seit 1. 4. 1980 als Oberarzt der Chirurgie tätig bin. Die Anerkennung als Arzt für Chirurgie wurde mir zum 30. 3. 1981, die Anerkennung für die Teilgebietsbezeichnung Unfallchirurgie nach bestandener Prüfung am 26. 11. 1981 von der Ärztekammer Nordrhein erteilt.

